

INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps. Each original is also photographed in one exposure and is included in reduced form at the back of the book.

Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.



Bell & Howell Information and Learning
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA
800-521-0600

Université de Sherbrooke

**Activation des canaux K^+ dépendants du Ca^{2+} par l'acide époxyeicosatrienoïque
et son rôle en physiologie des muscles lisses des voies respiratoires**

par

Marc Dumoulin

Département de Physiologie et Biophysique

en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)

en Physiologie (Biophysique)

28 janvier 1998



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-40577-X

Canada

à Émilie

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	I
LISTE DES FIGURES.....	III
LISTE DES TABLEAUX.....	IV
LISTE DES SYMBOLES ET ABBRÉVIATIONS.....	V
RÉSUMÉ	
1. INTRODUCTION	
1.1 Contraction / relaxation des muscles lisses des voies respiratoires.....	1
1.2 Les canaux potassiques de types Kca.....	11
1.3 L'importance physiologique des canaux Kca des muscles lisses des voies respiratoires.....	14
1.4 Modulation des muscles lisses des voies respiratoires par l'épithélium.....	16
1.5 L'acide époxyeicosatriénoïque.....	20
1.6 Contexte du projet.....	23
1.7 Objectif du projet.....	24
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	
2.1 Préparation du matériel biologique pour les études de reconstitution membranaire.....	26
2.2 Technique de reconstitution membranaire.....	27
2.2.1 Analyse des courants.....	31

2.2.2 Études pharmacologiques.....	32
2.3 Préparation des fragments de bronches de cobayes.....	35
2.4 Mesure de tensions musculaires isométriques.....	35
2.5 Analyses statistiques.....	37
2.6 Réactifs chimiques.....	37
 3. RÉSULTATS	
3.1 Mesures de courants unitaires médiés par les K_{Ca}	38
3.1.1 Canaux potassique et chlore reconstitués.....	38
3.1.2 Caractérisations biophysique et pharmacologique des canaux K_{Ca}	38
3.1.3 Effets du 11,12-EET sur les canaux K_{Ca}	49
3.1.4 Expériences de contrôle avec l'éthanol, l'AA et le PAF.....	61
3.1.5 Étude de l'implication d'une protéine G dans les effets du 11,12-EET.....	66
3.2 Mesures de tensions musculaires isométriques.....	66
 4. DISCUSSION	
4.1 Identification et caractérisation des canaux K_{Ca}	72
4.2 Effets du 11,12-EET et d'autres lipides sur les canaux K_{Ca}	76
4.3 Effets du 11,12-EET sur les muscles lisses des voies respiratoires.....	83
5. CONCLUSION.....	85
REMERCIEMENTS.....	87
BIBLIOGRAPHIE.....	88

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Production de l'IP₃ et du DAG	2
Figure 1.2	Représentation schématique du récepteur IP₃.....	4
Figure 1.3	Élévation du Ca²⁺ myoplasmique par la stimulation muscarinique.....	5
Figure 1.4	Régulation des éléments contractiles du muscle lisse.....	8
Figure 1.5	Génération de la contraction musculaire.....	9
Figure 1.6	Les sous-unités α et β du canal K_{Ca}.....	12
Figure 1.7	Modulation du muscle lisse vasculaire par l'endothélium.....	19
Figure 1.8	Métabolisme de l'acide arachidonique.....	21
Figure 1.9	La voie de l'époxygénation de l'acide arachidonique.....	22
Figure 2.1	Préparation de la fraction microsomale brute.....	28
Figure 2.2	Montage expérimental pour les reconstitutions membranaires.....	30
Figure 2.3	Histogrammes d'amplitudes pour le calcul de la Po du canal.....	33
Figure 3.1	Identification du canal K_{Ca} et d'un canal Cl⁻.....	39
Figure 3.2	Courbes courant / voltage.....	41
Figure 3.3	Po en fonction du voltage.....	44
Figure 3.4	Po en fonction du voltage avec des membrane formées de DOTAP.....	45
Figure 3.5	Po en fonction de la [Ca²⁺] cytoplasmique.....	48
Figure 3.6	Effet du TEA.....	51
Figure 3.7	Effet de l'IbTX.....	53
Figure 3.8	Effet du 11,12-EET extracellulaire sur la Po des canaux.....	55

Figure 3.9 Effet du 11,12-EET sur les constantes de temps.....	58
Figure 3.10 Effet du 11,12-EET sur la conductance des canaux.....	60
Figure 3.11 Expériences de contrôles pour les effets du 11,12-EET.....	63
Figure 3.12 Activation des canaux K_{Ca} par l'acide arachidonique.....	65
Figure 3.13 Étude de l'implication d'une protéine G pour l'activation des canaux.....	67
Figure 3.14 Relaxation des muscles lisses bronchiques par le 11,12-EET.....	70

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1 Relaxation des MLVR par le 11,12-EET dilué dans l'éthanol et le DMSO.....	71
--	-----------

LISTE DES SYMBOLES ET ABBRÉVIATION

AA	acide arachidonique
AC	adénylate cyclase
Ach	acétylcholine
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ADNc	adénosine déoxyribonucléique complémentaire
ATP	adénosine triphosphate
BLP	bicouche lipidique plane
CaM kinase II	protéine kinase de type II dépendante de la calmoduline
ChTX	Charybdotoxine
CYT P450	cytochrome P450
DAG	diacylglycérol
DHETs	acides dihydroyeicosatrienoïques
DOTAP	1-2 bis (oléoyloxy)- 3(triméthylammonio) propane
DTT	(DL)-Dithiothrétol
EDHF	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor
EDRF	Endothelium-Derived Relaxing Factor
EET	acide époxyeicosatrienoïque
EpDCF	Epithelium-Derived Contracting Factor
EpDHF	Epithelium-Derived Hyperpolarizing Factor

EpDRF	Epithelium-Derived Relaxing Factor
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
HETEs	acides hydroxyeicosatetraenoïques
IbTX	ibériotoxine
IP₃	1,4,5-inositol trisphosphate
Kca	canaux K⁺ activés par le Ca²⁺
LTs	leucotriènes
MLCK	kinase des chaînes légères de la myosine
MLCP	phosphatase des chaînes légères de la myosine
MLV	muscle lisse vasculaire
MLVR	muscles lissés des voies respiratoires
NO	oxyde nitrique
NOS	Nitric Oxyde Synthase
PGs	prostaglandines
PKA	protéine kinase dépendante du AMPc
PKC	protéine kinase C
PKG	protéine kinase dépendante du GMPc
PLC-β	phospholipase C de type β
Po	probabilité d'ouverture
PTX	toxine de Pertussis
ROC	Receptor-Operated Channel
RE	réticulum endoplasmique

TEA	tetraéthylammonium
Txs	thromboxanes
VOC	Voltage-Operated Channel

RÉSUMÉ

Le tonus et le métabolisme des muscles lisses des voies respiratoires sont modulés par plusieurs facteurs épithéliaux. L'acide arachidonique des cellules épithéliales est métabolisé par trois voies différentes et les produits synthétisés sont des facteurs qui modulent l'activité des muscles lisses des voies respiratoires. Les trois voies du métabolisme de l'acide arachidonique sont la lipoxygénation, la cyclooxygénation, et l'époxygénation. L'époxygénation catalysée par le cytochrome P450, est moins connu au niveau des cellules épithéliales des trachées et des bronches. Cette voie métabolique permet la production des acides époxyeicosatriénoïques (EETs). Quatre régioisomères peuvent être synthétisés par le cytochrome P450: le 5,6-EET, le 8,9-EET, le 11,12-EET, et le 14,15-EET. Il est connu que ces isomères sont responsables de la relaxation des muscles lisses vasculaires de plusieurs tissus, et que cette relaxation est médiée par une hyperpolarisation des cellules musculaires. L'activation des canaux K^+ de grande conductance, sensibles au ions Ca^{2+} , appelés les canaux K_{Ca} sont les canaux qui causent cette hyperpolarisation. Les EETs activeraient une protéine G de la famille G_i pour l'activation des canaux K_{Ca} par un mécanisme encore mal compris. Il est proposé que les EETs représentent des endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHFs). Les effets des EETs au niveau des canaux K_{Ca} des muscles lisses des voies respiratoires n'ont pas encore été étudiés. Par contre, il est connu que les EETs causent une relaxation des muscles lisses des bronches de cobayes. Ce travail présente l'étude de la modulation des canaux K_{Ca} des muscles lisses des voies respiratoires par les EETs. Nous avons démontré

que l'isomère 11,12-EET active directement les canaux K_{Ca} , sans l'implication d'une protéine G. Des concentrations de 0.9 - 3.0 μ M multiplient par 1.2 - 4 la probabilité d'ouverture des canaux K_{Ca} sans affecter leur conductance. De plus, les effets du 11,12-EET sont présents lorsque la molécule exogène est ajoutée du côté extracellulaire (*cis*), et non du côté cytoplasmique (*trans*) du canal. Le précurseur du 11,12-EET, l'acide arachidonique, induit aussi une activation des canaux K_{Ca} mais à des concentrations beaucoup plus élevées. Par contre les platelet-activating factors (PAF) n'a aucun effet direct sur le canal, même à des concentrations de 10 μ M. Le 11,12-EET n'induit pas une plus grande activation des canaux K_{Ca} avec la présence de GTP du côté cytoplasmique, et donc l'hypothèse de la double activation de ces canaux par le 11,12-EET n'a pas été retenue. Finalement, le 11,12-EET induit une relaxation des muscles lisses des bronches de cobayes contractés avec le carbamylcholine, un agoniste muscarinique. Des concentrations de 1.5 à 3.0 μ M induisent de 3 à 6% de relaxation des muscles de bronches contractés. Les résultats obtenus, tant au niveau moléculaire que tissulaire, nous amène à proposer que le 11,12-EET représente les Epithelium-Derived Hyperpolarizing Factors (EpDHF).

Mots clés : acide arachidonique, cytochrome P450, muscles lisses, bronches, canaux ioniques.

1. INTRODUCTION

1.1 Contraction / relaxation des muscles lisses des voies respiratoires

Les muscles lisses des voies respiratoires (MLVR) des mammifères ont pour fonction principale de contrôler le diamètre des voies aériennes, et ainsi, de contrôler la résistance au flux d'air entre l'atmosphère et les alvéoles. Le tonus des muscles lisses respiratoires est modulé par une grande variété de signaux, tels que l'acétylcholine (ACh), l'histamine, l'oxyde nitrique, et des neuropeptides (Barnes, 1988 ; Leff, 1988 ; Douglas, 1990). Le couplage excitation-contraction au niveau de ces muscles consiste en un couplage électromécanique, via le potentiel de membrane des cellules musculaires, et en un couplage pharmacomécanique, via certains seconds messagers ainsi que selon la concentration de calcium (Ca^{2+}) libre myoplasmique (Somlyo et Somlyo, 1968 ; Carl *et al.*, 1996). La régulation muscarinique, via l'innervation parasympathique, est le principal déterminant inotrope positif du tonus des muscles lisses des voies aériennes. La liaison de l'ACh, un agoniste muscarinique, sur un récepteur (M_2 ou M_3 au niveau des MLVR), résulte en une dépolarisation des cellules musculaires et en une augmentation transitoire et soutenue du Ca^{2+} myoplasmique.

Le Ca^{2+} joue un rôle central au niveau des muscles lisses respiratoires. L'activation de la phospholipase C- β (PLC- β) via une protéine G de la famille G_q qui est liée au récepteur muscarinique M_3 , amènera la production de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) et

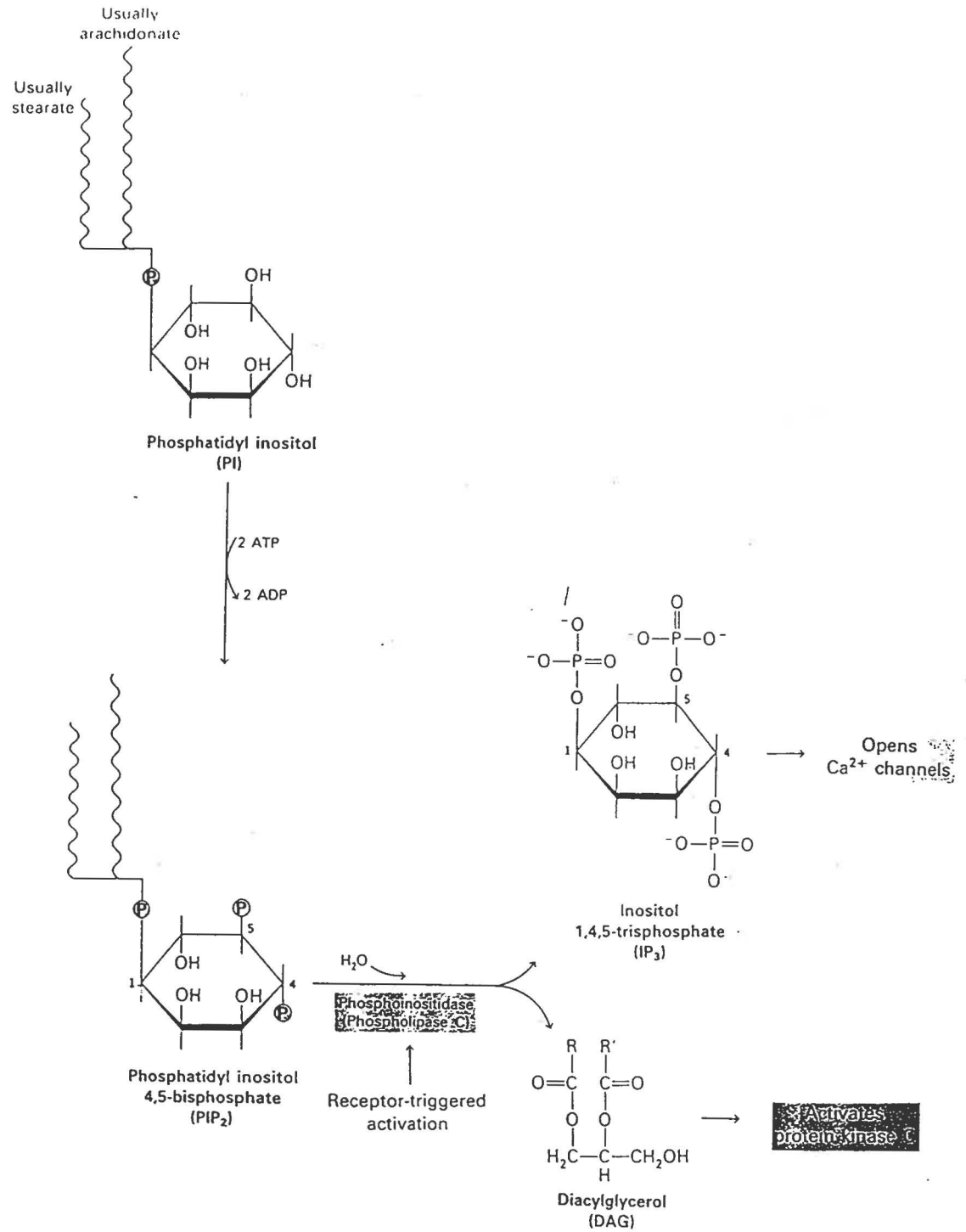


Figure 1.1 Mécanisme de la production de l'inositol 1,4,5-triphosphate et du diacylglycérol à partir du phosphatidylinositol. (D'après Voet et Voet, 1990)

du diacylglycérol (DAG) à partir du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) de la membrane sarcolemmale (Grandordy *et al.*, 1986 ; Robertson *et al.*, 1988 ; Meurs *et al.*, 1989). La figure 1.1 décrit le mécanisme biochimique amenant à la production de l'IP₃ et du DAG. L'IP₃ ira activer des canaux calciques du réticulum endoplasmique (RE), sensibles à l'IP₃ (Fig. 1.2), qui aura pour conséquence d'élever transitoirement la concentration de Ca²⁺ du myoplasme (Hashimoto *et al.*, 1985). Le DAG ira activer une protéine kinase C (PKC), qui elle, catalysera la phosphorylation et ainsi l'inhibition de certaines phosphatases. L'inhibition de phosphatases responsables de la déphosphorylation des chaînes de myosine, favorisera la contraction du muscle lisse. De plus, l'augmentation de la concentration du Ca²⁺ myoplasmique par l'activation des canaux Ca²⁺ du RE activera des canaux Cl⁻ calcium-dépendant (Wang *et al.*, 1997). Lors de la liaison de l'ACh à un récepteur muscarinique de type M₂, des protéines G des familles G_i et G_o, des protéines sensibles à la toxine de pertussis (PTX), activeront des canaux cationiques non-sélectifs, possiblement calcium-dépendant (Wang *et al.*, 1997). L'activation des canaux cationiques non-sélectifs et des canaux Cl⁻ causeront une dépolarisation (15-20 mV) de la membrane de surface (Kirkpatrick, 1975 ; Coburn, 1977). Des canaux calciques voltage-dépendant (VOC), sensibles aux dihydropyridines et activés par la dépolarisation, laisseront entrer le Ca²⁺ extracellulaire dans le myoplasme (Kotlikoff, 1988 ; Worley et Kotlikoff, 1990 ; Tomasic *et al.*, 1992); d'autres types de canaux calciques de la membrane de surface, les canaux appelés receptor-operated channels (ROC), insensibles à la dihydropyridine, seront aussi activés lors de la stimulation cholinergique et seront responsables de l'augmentation de la concentration du Ca²⁺ myoplasmique (Cuthbert *et al.*,

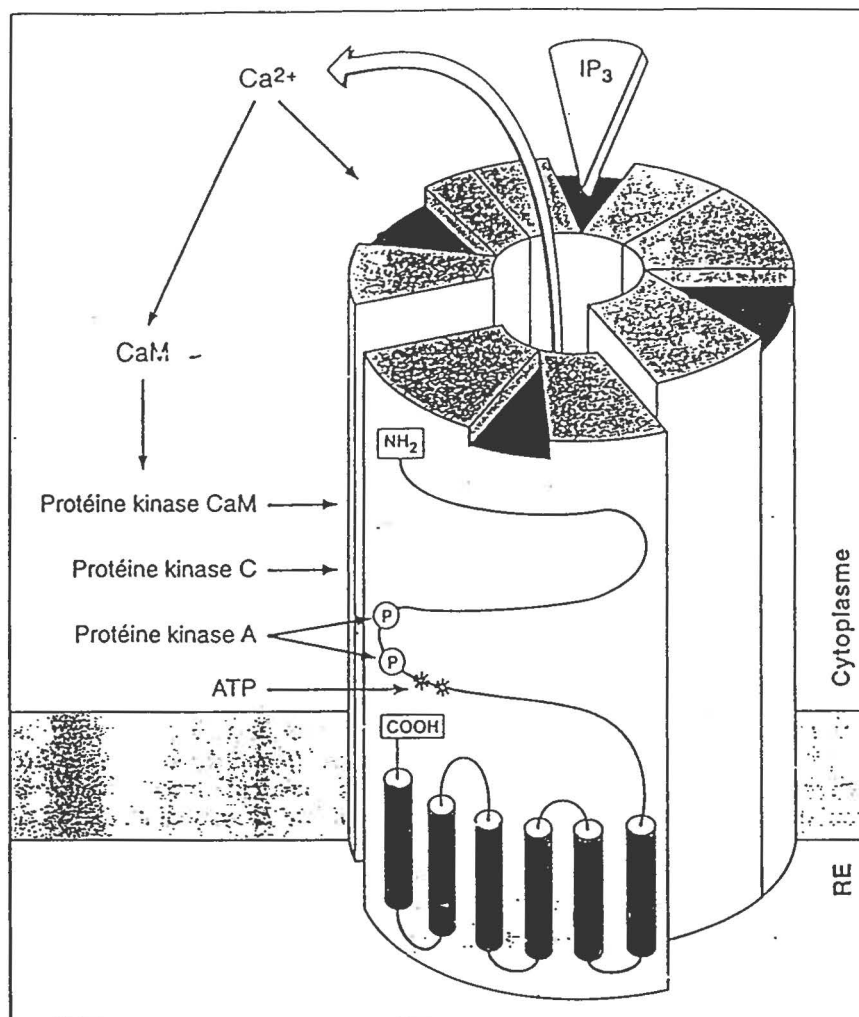


Figure 1.2. Représentation schématique du récepteur de l'IP₃ au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. (D'après Mauger, 1994)

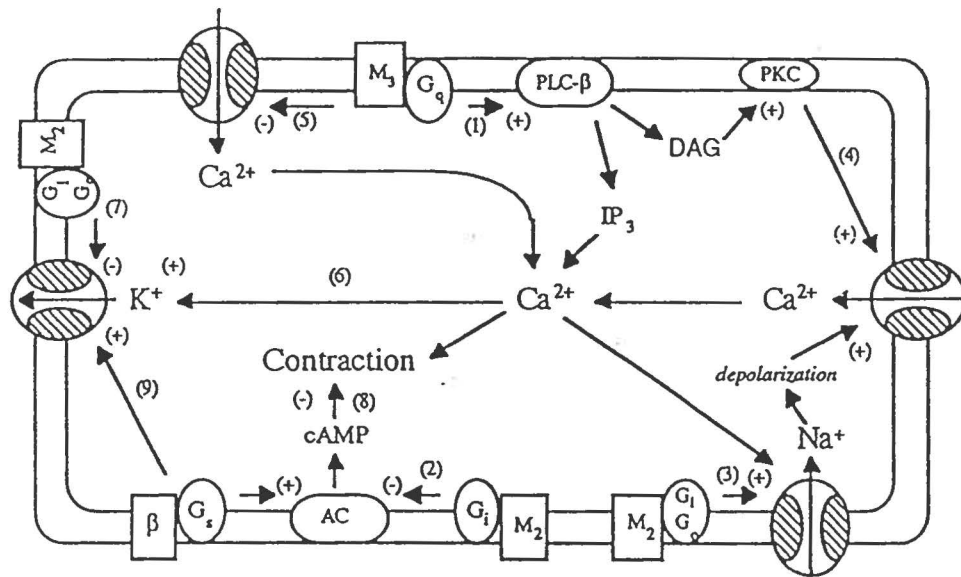


Figure 1.3. Élévation du Ca^{2+} du myoplasme par la stimulation muscarinique.

(D'après Ehlert *et al.*, 1997)

1994). Les différentes cascades amenant à l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} dans le myoplasme sont présentées à la figure 1.3. La concentration de Ca^{2+} libre myoplasmique passera de 100 nM environ, au repos, à une concentration près de 1 μM suite à la stimulation cholinergique; la concentration de Ca^{2+} est soutenue à une concentration de 150-200 nM pendant la contraction (Murray et Kotlikoff, 1991). Il a été démontré que l'augmentation rapide du Ca^{2+} , la première phase, serait due à l'activation des canaux calciques du RE, activés par IP_3 , et que par la suite, une concentration de 150-200 μM serait maintenue par l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire (Kajita et Yamaguchi, 1993). L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} dans le myoplasme est la première étape qui déclenche la cascade biochimique amenant à la contraction du muscle lisse.

Dans le myoplasme, le Ca^{2+} libre se lie à une protéine, la calmoduline (CaM), avec une stoechiométrie de quatre ions Ca^{2+} pour une molécule de CaM. Le complexe Ca^{2+} -calmoduline ira se lier à une protéine kinase des chaînes légères de myosines (MLCK). La liaison du complexe Ca^{2+} -calmoduline activera la MLCK, qui ira phosphoryler, en présence d'ATP, les chaînes légères de myosine de poids moléculaire de 20-kDa (Dabrowska *et al.*, 1977 ; Dabrowska *et al.*, 1978). La phosphorylation des chaînes de myosine de 20-kDa permettra la liaison des chaînes lourdes de myosine avec les filaments d'actine, et le complexe actomyosine-ATPase sera activé. Ce complexe enzymatique est responsable de l'hydrolyse de l'ATP, fournissant l'énergie nécessaire aux changements de conformation des têtes de myosine. Ces réactions amèneront le déplacement de la myosine sur le filament d'actine, et la contraction du muscle lisse. La liaison myosine-actine sera

favorisée par l'activation d'une protéine kinase de type II Ca^{2+} -calmoduline-dépendante (CaM kinase II), un enzyme responsable de la phosphorylation de protéines liées aux filaments d'actine (Pohl *et al.*, 1991). Les protéines liées à l'actine sont la tropomyosine, la caldesmone et la calponine. Ces dernières sont responsables de l'inhibition de l'actomyosine ATPase. La phosphorylation de la caldesmone et de la calponine par la CaM kinase II déplacera les protéines régulatrices de leur site de liaison et favorisera les interactions de la myosine avec les filaments d'actine. Le mécanisme de la contraction des muscles lisses est présenté sur les schémas des figures 1.4 et 1.5. De plus, l'inhibition des phosphatases des chaînes légères de myosine (MLCP), responsables de la déphosphorylation des chaînes légères de myosine, favorisera la contraction du muscle. L'équilibre entre les activités MLCK / MLCP est un déterminant du tonus musculaire, et c'est l'augmentation ou la diminution du Ca^{2+} intracellulaire qui sera responsable d'un déséquilibre de ce rapport kinases / phosphatases, amenant la contraction ou la relaxation du muscle lisse. Certaines protéines kinases, telle que la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA), seront responsables de la phosphorylation des MLCK, causant leur inhibition (Stull *et al.*, 1990). La baisse de l'activité des MLCK causera un déséquilibre phosphorylation / déphosphorylation des chaînes légères de myosine en faveur de la déphosphorylation, et le muscle tendra à se relaxer.

En plus de ces cascades enzymatiques amenant à la contraction du muscle lisse, une dépolarisation soutenue des cellules musculaires est présente pour favoriser la contraction. D'autres facteurs auront donc pour fonction d'inhiber certains canaux ioniques, tels que les canaux potassiques, pour empêcher un courant sortant, qui sera responsable de

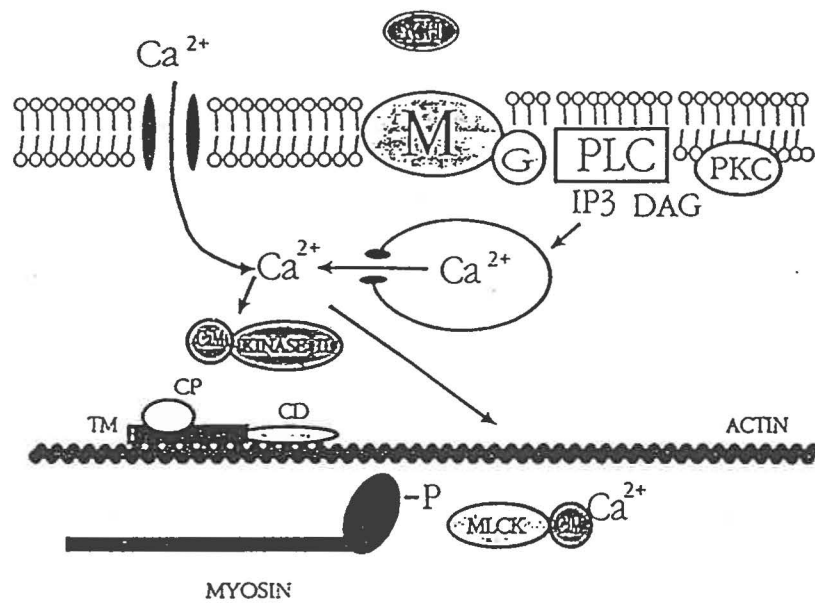


Figure 1.4. Représentation schématique de la régulation des éléments contractiles des muscles lisses des voies respiratoires. (D'après Gerthoffer, 1991)

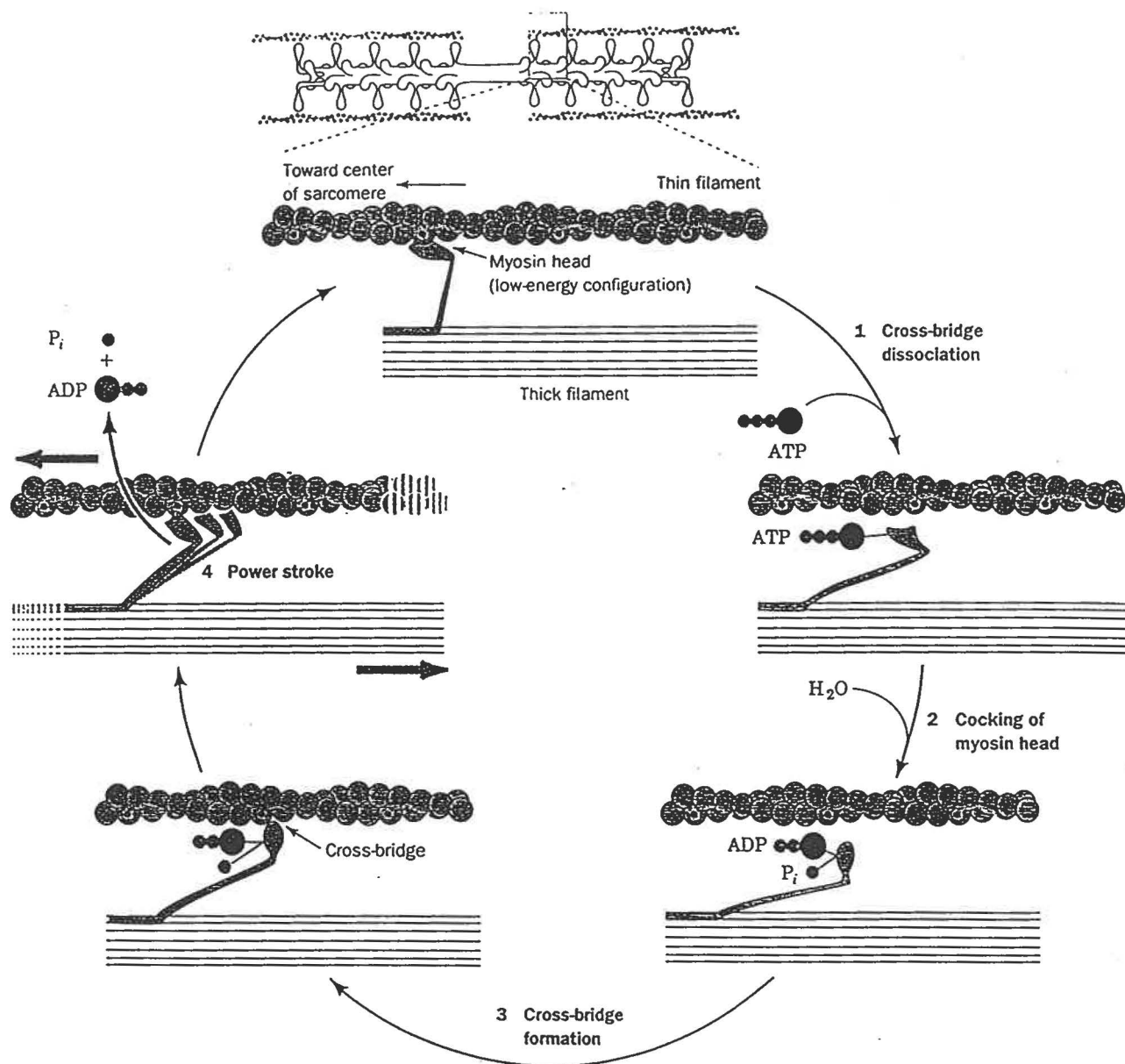


Figure 1.5 Le mécanisme de la génération de force du muscle par la liaison de la myosine sur les filaments d'actine et l'hydrolyse de l'ATP (D'après Voet et Voet 1990)

la repolarisation des cellules. Les canaux potassiques de grandes conductances, sensibles au Ca^{2+} myoplasmique et au potentiel de membrane, nommés les canaux de type K_{Ca} , sont les principaux canaux inhibés pendant la contraction des muscles lisses respiratoires (Kume et Kotlikoff, 1991 ; Kotlikoff *et al.*, 1992). Les canaux K_{Ca} sont présents en quantité très élevée au niveau des MLVR et seraient responsables du maintien du tonus de base de ces muscles, ou du retour au repos suite à une contraction (McCann et Welsh, 1986). L'inhibition de ces canaux serait due principalement à l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC) par la protéine G_i , une protéine G liée au récepteur muscarinique M_2 . La baisse de concentration de l'AMPc due à l'inhibition de l'AC et à la présence de phosphodiesterases (PDE), responsables de la dégradation de l'AMPc, causera la désactivation des PKA. Les PKA sont responsables de la phosphorylation de plusieurs protéines dont les MLCK et les canaux potassiques de type K_{Ca} , qui sont activés par une phosphorylation (Kume *et al.*, 1989). L'inhibition de la phosphorylation des canaux K_{Ca} , ainsi que leur déphosphorylation par des phosphatases, empêcheront leur activation (Kume et Kotlikoff, 1991).

La noradrénaline du système nerveux sympathique et l'adrénaline de la médullosurrénale sont responsables de la relaxation des MLVR. La relaxation est causée par la liaison d'agonistes sur les récepteurs β_2 -adrénergiques (Kotlikoff *et al.*, 1996). Cette liaison activera une protéine G de la famille G_s , responsable de l'activation de l'AC (Kahl et Gilman, 1984). L'augmentation de la concentration d'AMPc activera la PKA et la PKG (Torphy *et al.*, 1982). La PKA inhibe les MLCK et active les canaux K_{Ca} , et module l'activité d'autres types de protéines telles que la Na^+/K^+ ATPase (Knox et Brown, 1991 ;

Knox et Tattersfield, 1995). L'activation de la Na^+/K^+ ATPase causera la sortie de Ca^{2+} par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Ces modulations favoriseront la repolarisation des cellules dépolarisées lors de la contraction, et conséquemment, les canaux calciques voltage-dépendants seront inhibés, amenant ainsi la baisse de Ca^{2+} myoplasmique. La PKG, en plus de phosphoryler les canaux potassiques de type K_{Ca} (Alioua *et al.* 1995), activerait les pompes de type Mg^{2+} - Ca^{2+} -ATPase du RS, ce qui contribuerait à diminuer la concentration du Ca^{2+} myoplasmique libre (Vrolix *et al.*, 1988). La baisse de concentration de Ca^{2+} provoquera une désactivation de la MLCK qui est activée par le complexe Ca^{2+} -calmoduline. L'arrêt de la phosphorylation des chaînes légères de myosines par la MLCK, et la déphosphorylation par les MLCP, auront pour effet le découplage de la myosine avec l'actine, et ainsi l'arrêt de la contraction. Parallèlement à l'activation de l'AC, la sous-unité α des protéines G_i ira affecter directement la conductance potassique médiée par les canaux potassiques de type K_{Ca} , amenant la relaxation des muscles lisses (Kume *et al.* 1994). La relaxation sera ainsi accompagnée d'une repolarisation et d'une hyperpolarisation des cellules musculaires.

1.2 Les canaux potassiques de type K_{Ca}

Les canaux potassiques de type K_{Ca} sont des hétéromultimères composés de quatre sous-unités α et quatre sous-unités β (Kaczorowski *et al.*, 1996). Les deux types de sous-unités ont été purifiées et clônées chez les mammifères (Butler *et al.*, 1993 ; Garcia-Calvo *et al.*, 1994 ; Knaus *et al.*, 1994). La figure 1.6 schématise les deux sous-unités du canal K_{Ca} . La sous-unité α est une protéine de 62-kDa et comprend, à partir de la partie N-

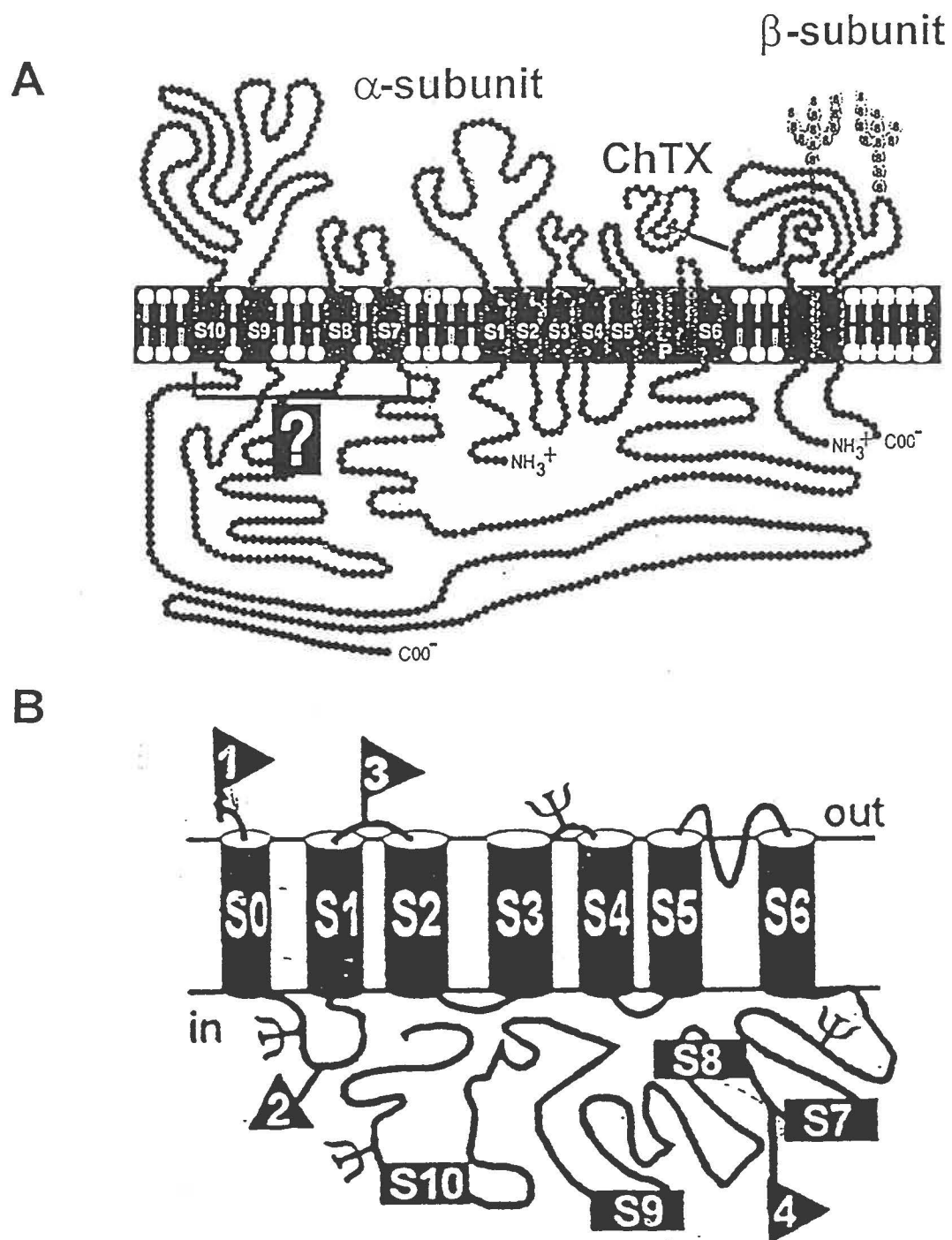


Figure 1.6. **A** Représentation des sous-unités α et β du canal K⁺ de type K_{Ca}. (D'après Kaczorowski *et al.*, 1996). **B** Représentation de la sous-unité α , selon Meera *et al.*, 1997.

terminal, six (ou sept) segments transmembranaires (S1-S6 ou S0-S6), selon les auteurs. Ces segments incluent le senseur de voltage sur le segment transmembranaire S4, un segment qui possède plusieurs charges positives, ainsi que le pore du canal (P-loop) présent entre les segments S5 et S6. De plus, quatre segments transmembranaires supplémentaires sont présents en C-terminal (S7-S10), dont les segments S9 et S10 qui pourraient posséder des sites de liaison au Ca^{2+} (Wei *et al.*, 1994). L'étude de la séquence d'acides aminés des sous-unités α a indiqué la présence d'un site de reconnaissance de la PKA et plusieurs sites de phosphorylation par la PKC (Kaczorowski *et al.*, 1996). L'expression des sous-unités α seulement, dans des oocytes, peut former des canaux ayant des propriétés des canaux de type K_{Ca} . Un canal formé seulement de sous-unités α possède une conductance semblable au canal natif, c'est-à-dire, 200-300 pS en condition symétrique (140/140 mM KCl) et 100-150 pS dans les conditions physiologiques, et possède une sélectivité ionique semblable (plus sélectif aux ions K^+ que Na^+). Par contre, la présence des sous-unités β à des effets marqués au niveau des propriétés pharmacologiques du canal (McManus *et al.*, 1995). Les sous-unités β sont des glycoprotéines de 31-kDa qui présentent deux segments transmembranaires et qui sont associées de façon non-covalente aux sous-unités α dans une stoechiométrie 1:1 (Knaus *et al.*, 1994). Des canaux exprimés dans des oocytes, par l'ADNc du canal K_{Ca} qui code pour les deux sous-unités, ont montré une plus grande sensibilité au voltage et à la concentration de Ca^{2+} libre myoplasmique que lorsque la sous-unité α est exprimée seule. Donc, les deux sous-unités contribuent aux propriétés fonctionnelles des canaux K_{Ca} , et les deux sous-unités sont requises pour reconstituer les propriétés des canaux observés dans les cellules musculaires. Les gènes dSlo (Elkins *et al.*,

1986), mSlo (Butler *et al.*, 1993) et hSlo (Dworetzky *et al.*, 1994), codant pour les protéines du canal K_{Ca} , ont été clônés chez la Drosophile, la souris, et l'humain, respectivement. Ces gènes ont été exprimés et reconstitués dans les ovocytes de grenouille pour en étudier les propriétés biophysiques et pharmacologiques et pour comparer la régulation des différentes isoformes de ces canaux.

La régulation des canaux K_{Ca} par le voltage est étroitement liée à la régulation par le Ca^{2+} (Carl *et al.*, 1996). Il n'est pas encore clair si la liaison des ions Ca^{2+} module le senseur de voltage, ou si la dépendance au voltage des canaux est due à la dépendance au voltage de la liaison des ions Ca^{2+} . Il est connu qu'une dépolarisation de la membrane active les canaux K_{Ca} et que cette activation est médiée par le segment S4 de la sous-unité α . Par contre, il a été rapporté que des sites de liaison au Ca^{2+} pourraient être présents au niveau des segments C-terminal, soit S7-S10. À l'aide de canaux reconstitués dans les oocytes à partir des gènes dSlo et mSlo, et par mutagenèse, des auteurs ont remarqué que la dernière partie du canal, S9-S10, était essentielle à son activation, indépendamment du voltage (Wei *et al.* 1994). Généralement, dans la littérature, les effets du Ca^{2+} sont décrits par le déplacement de la courbe Po / voltage, c'est-à-dire, la courbe qui relie la probabilité d'ouverture des canaux au voltage (Savaria *et al.*, 1992 ; Wei *et al.*, 1994). Les canaux K_{Ca} ont une activation maximale à des concentrations de Ca^{2+} libre cytoplasmique supérieures à 1 μ M (Carl *et al.*, 1996).

1.3 L'importance physiologique des canaux K_{Ca} des muscles lisses des voies respiratoires

Afin d'étudier le rôle des canaux K_{Ca} au niveau des MLVR, plusieurs auteurs ont utilisé des bloqueurs de ces canaux, tels que la charybdotoxine (ChTX), l'ibérottoxine (IbTX) et le tétraéthylammonium (TEA) (Savaria *et al.*, 1992 ; Jones *et al.*, 1993 ; Hiramatsu *et al.*, 1994 ; Kume *et al.*, 1995). D'après les études au niveau des MLVR utilisant ces bloqueurs, il a été observé que l'activation des canaux K_{Ca} était importante dans le contrôle de la relaxation des muscles lisses induite par la stimulation β_2 -adénergique. Ainsi, lors d'une contraction soutenue, les canaux K_{Ca} doivent être inhibés. La stimulation muscarinique qui cause la contraction des MLVR, inhibe la conductance potassique médiée par ces canaux. Lors d'une contraction, il y a une augmentation transitoire de la concentration de Ca^{2+} libre sous la membrane de surface qui approche 1 μM ; de plus, il y a une dépolarisation de la cellule musculaire d'environ 15-20 mV (Kotlikoff *et al.*, 1992). Ces conditions sont favorables à une légère activation des canaux potassiques de type K_{Ca} qui sont activés par le Ca^{2+} intracellulaire et par une dépolarisation. Donc, considérant que les canaux K_{Ca} sont de grande conductance et qu'ils sont présents en nombre important au niveau des membranes de surface des cellules des MLVR, l'activation de ces canaux devrait produire la repolarisation des cellules dépolarisées, immédiatement après la stimulation cholinergique. La repolarisation amènera une baisse de la concentration du Ca^{2+} libre cytoplasmique, due à l'inhibition des canaux VOC, et ainsi la relaxation du muscle. Par contre, une contraction soutenue est observé *in vitro* suite à l'addition d'agonistes muscariniques et donc certains auteurs se sont interrogés sur les mécanismes menant à l'inhibition des canaux K_{Ca} (Kotlikoff *et al.*, 1992).

Il est maintenant connu que les canaux K_{Ca} sont activés par une phosphorylation, médiée par les PKA et les PKG (Kume *et al.*, 1989 ; Alioua *et al.*, 1995), et que la déphosphorylation tend à limiter leur activation. L'inhibition des canaux K_{Ca} se ferait par l'intermédiaire d'une protéine G de la famille G_i , sensible à la toxine de pertussis (PTX) et activée par une stimulation muscarinique (Kume *et al.*, 1991). Lors de l'incubation de cellules musculaires avec la PTX, une perte de l'inhibition des canaux K_{Ca} unitaires médiée par l'addition d'agonistes muscariniques a été observée. Ceci démontre la contribution des protéines G_i pour l'inhibition des canaux K_{Ca} . Cette inhibition sera très importante pour le maintien de la dépolarisation initiale suite à la stimulation cholinergique, et donc pour une concentration élevée et soutenue du Ca^{2+} libre intracellulaire, et la contraction soutenue du muscle lisse (Kotlikoff *et al.*, 1992).

1.4 Modulation des muscles lisses des voies respiratoires par l'épithélium

L'épithélium qui recouvre les muscles lisses des voies aériennes est important pour leur modulation. Plusieurs auteurs ont observé, *in vitro*, que si l'épithélium est enlevé des bronches et des trachées, les cellules musculaires sont dépolarisées d'environ 10-15 mV (Xie *et al.*, 1992 ; Matsumoto *et al.*, 1994 ; Salvail *et al.*, 1997). Plusieurs facteurs relâchés par les cellules épithéliales iront moduler l'activité du muscle lisse, tels que les leucotriènes (LTs), les prostaglandines (PGs), les thromboxanes (Tx), l'oxyde nitrique (NO), et certains autres facteurs moins connus et nommés les 'Epithelium-Derived Factors'. Pour ces derniers facteurs on retrouve 'l'Epithelium-Derived Relaxing Factor'

(EpDRF), 'l'Epithelium-Derived Contracting Factor' (EpDCF) et 'l'Epithelium-Derived Hyperpolarizing Factor' (EpDHF).

Le NO est connu au niveau vasculaire comme étant l'endothelium-derived relaxing factor (EDRF) (Ignarro *et al.*, 1987 ; Palmer *et al.*, 1987), et joue le même rôle au niveau des voies respiratoires. Son action se fait par l'activation des guanylate cyclases qui synthétisent le GMPc (Belvisi *et al.*, 1995). L'augmentation de la concentration de GMPc myoplasmique amène l'activation des PKG et donc, la phosphorylation de certaines protéines, dont les canaux K_{Ca} (Hamaguchi *et al.*, 1992). Il a été montré que le NO pouvait aussi avoir une action directe sur les canaux K_{Ca} au niveau vasculaire (Bolotina *et al.*, 1994) et au niveau des MLVR (Alioua *et al.*, 1997). L'effet du NO montre encore l'importance des canaux K_{Ca} dans la réactivité des MLVR. Les facteurs EpDCF et EpDHF n'ont pas encore été identifiés.

Les différents leucotriènes, LTC_4 , LTD_4 , et LTE_4 , produits par la lipoxigénase à partir de l'acide arachidonique (AA) au niveau des voies respiratoires, sont des bronchoconstricteurs et ont un rôle significatif dans la pathophysiologie de l'asthme (Drazen *et al.*, 1980 ; Ellis et Undem, 1991). Les prostaglandines PGD_2 et $PGF_{2\alpha}$, et le thromboxane TxA_2 sont aussi des bronchoconstricteurs, alors que les PGE_2 et les PGI_2 sont des bronchorelaxants (Hanley, 1986). Les PGs et les Txs sont produits par la cyclooxygénase à partir de l'AA. L'oxyde nitrique (NO) synthétisé par la NO synthase (NOS) des cellules épithéliales est un important bronchorelaxant (Belvisi *et al.*, 1992 ; Belvisi *et al.*, 1995 ; Ward *et al.*, 1995).

Au niveau des muscles lisses vasculaires (MLV), un dérivé de l'acide arachidonique, l'acide époxyeisatriénoïque (EET), induit la relaxation de plusieurs artères (Proctor *et al.*, 1987 ; Katoh *et al.*, 1991 ; Gebremedhin *et al.*, 1992 ; Hecker *et al.*, 1994 ; Fang *et al.*, 1996 ; Pratt *et al.*, 1996). Ce dérivé de l'AA est produit par une réaction de monooxygénation (époxygénation) par les cytochromes P450 (CYT P450) des cellules endothéliales (Fitzpatrick et Murphy, 1988 ; Capdevila *et al.*, 1992 ; Oliw, 1994 ; Rosolowsky et Campbell, 1996). L'EET induit une relaxation des muscles lisses de plusieurs artères, par une hyperpolarisation des cellules musculaires ; l'hyperpolarisation se ferait par l'activation des canaux K_{Ca} (Gebremedhin *et al.*, 1992 ; Hu et Kim, 1993 ; Campbell *et al.* 1996). La figure 1.7 montre les voies métaboliques des EETs parmi quelques voies de régulation des MLV par l'endothélium. Des études au niveau des canaux K_{Ca} unitaires de cellules des MLV ont montré que l'activation se ferait plutôt par l'activation d'une protéine G de la famille G_i (Li et Campbell, 1997). Le mécanisme d'activation de la protéine G_i par l'EET est encore inconnu. Les auteurs ont proposé l'activation d'un récepteur couplé à la protéine G, ou une liaison directe du 11,12-EET sur la protéine G en milieu intracellulaire. Plusieurs auteurs ont proposé que l'EET pourrait représenter l'endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), un facteur dont la présence a été observée *in vitro* (Garland *et al.*, 1995 ; Cohen et Vanhoutte, 1995 ; Campbell *et al.* 1996). Ce qui relie l'EET à l'EDHF est que ce dernier agit sur les canaux K_{Ca} pour induire une hyperpolarisation des cellules des MLV. On pourrait donc penser que l'EET puisse avoir le rôle de EpDHF au niveau des MLVR, un facteur postulé antérieurement (Matsumoto *et al.*, 1994).

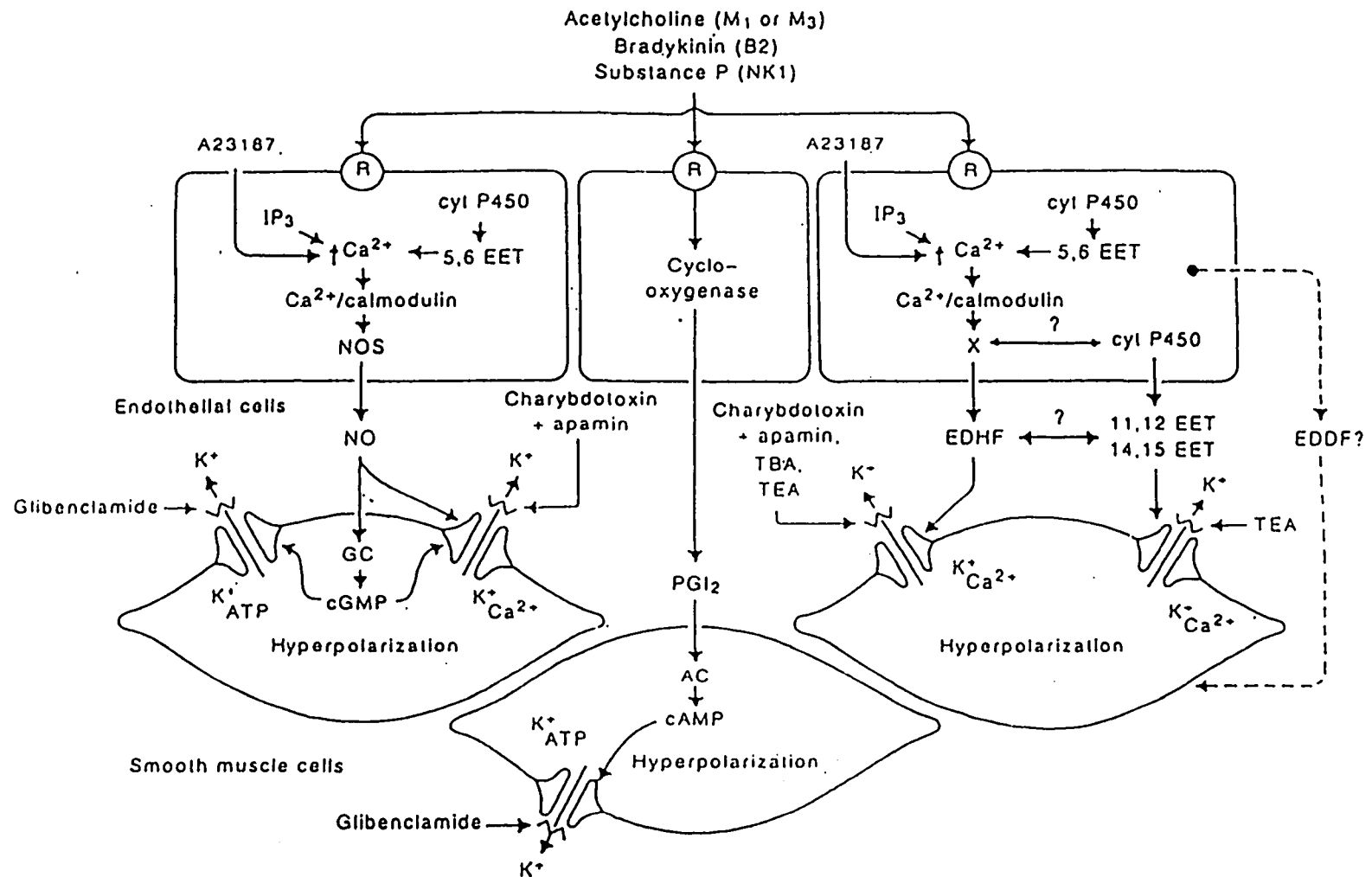


Figure 1.7. Schéma présentant les différentes voies de modulation des muscles lisses vasculaires par l'endothélium. (D'après Félétou et Vanhoutte, 1996)

1.5 L'acide époxyeicosatriénoïque

L'acide époxyeicosatriénoïque (EET) est une molécule dérivée de l'acide arachidonique (AA). Sa synthèse, comme mentionné plus haut, se fait par une réaction de monooxygénation (époxydation) catalysée par la CYT P450 époxygénase. Cette réaction CYT P450-dépendante requiert de l'oxygène moléculaire et le NADPH dans une stoechiométrie 1:1 (Capdevila *et al.*, 1992). La voie métabolique du CYT P450 est considérée comme la troisième voie du métabolisme de l'AA; la lipoxygénation et la cyclooxygénation sont les deux autres voies métaboliques (Fig. 1.8). On retrouve les CYT P450 au niveau des reins (Kato *et al.*, 1991 ; Karara *et al.*, 1993), du foie (Karara *et al.*, 1989), des poumons (Zeldin *et al.*, 1995), et au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Pinto *et al.*, 1987). Au niveau du tissu pulmonaire, les CYT P450 sont présents dans les cellules Clara et les pneumocytes de type II (Serabjit-Singh *et al.*, 1988). Les différents types de CYT P450 dans ces cellules sont les CYP2B4, CYP4B1 et CYP2B4 (Zeldin *et al.*, 1995). Le CYP2B4 est celui qui possède la plus grande activité époxygénase au niveau des cellules pulmonaires. Les autres produits synthétisés par les CYT P450 à partir de l'AA sont les acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs) et les alcools C-19 et C-20 (19-OH-AA et 20-OH-AA).

L'époxydation de l'AA peut donner quatre régioisomères, soit le 5,6-, le 8,9-, le 11,12-, et le 14,15-EET (Capdevila *et al.*, 1992), comme présenté à la figure 1.9. La

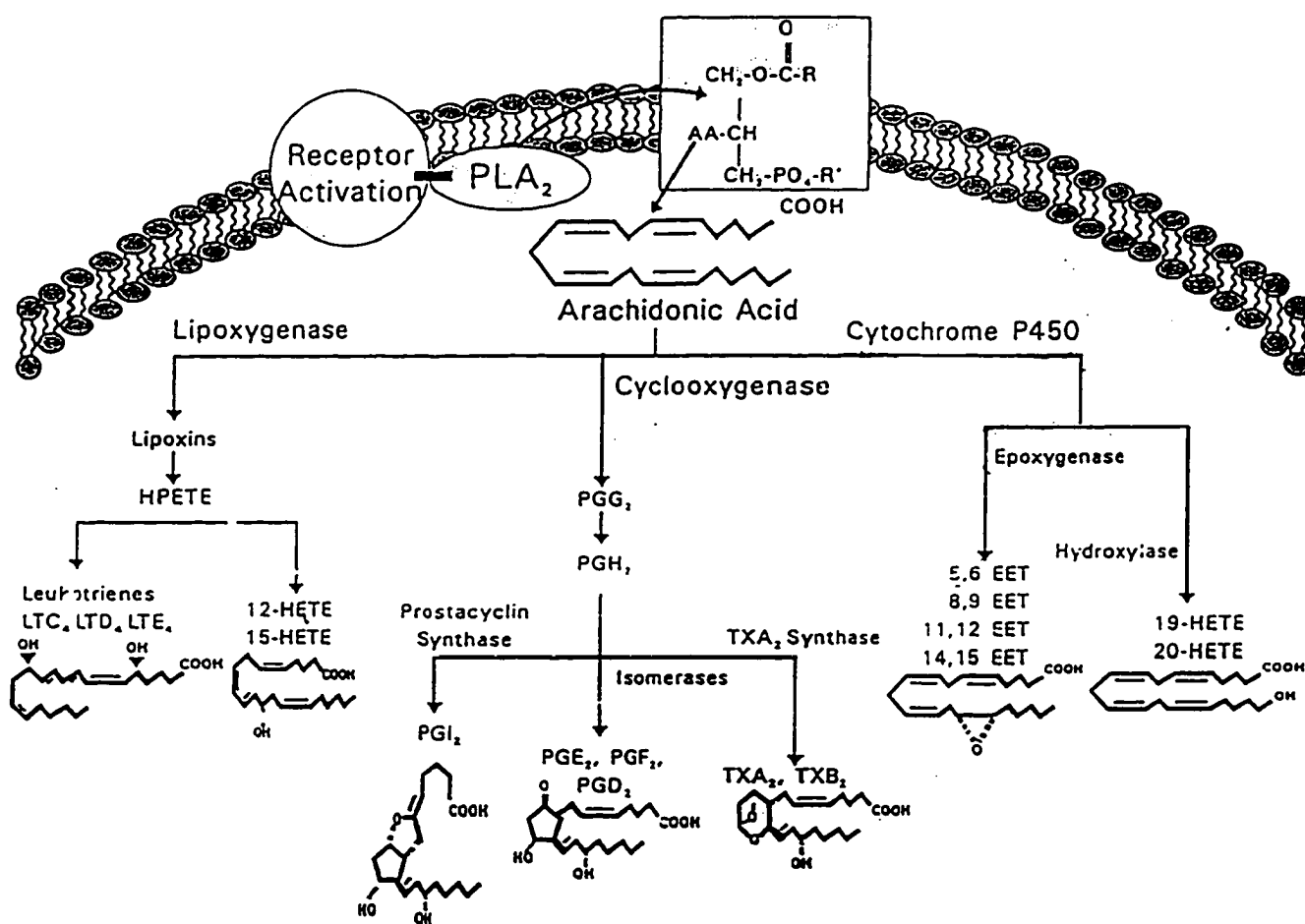


Figure 1.8. Schéma présentant les différentes voies métaboliques de l'acide arachidonique.

(D'après Navar *et al.*, 1996)

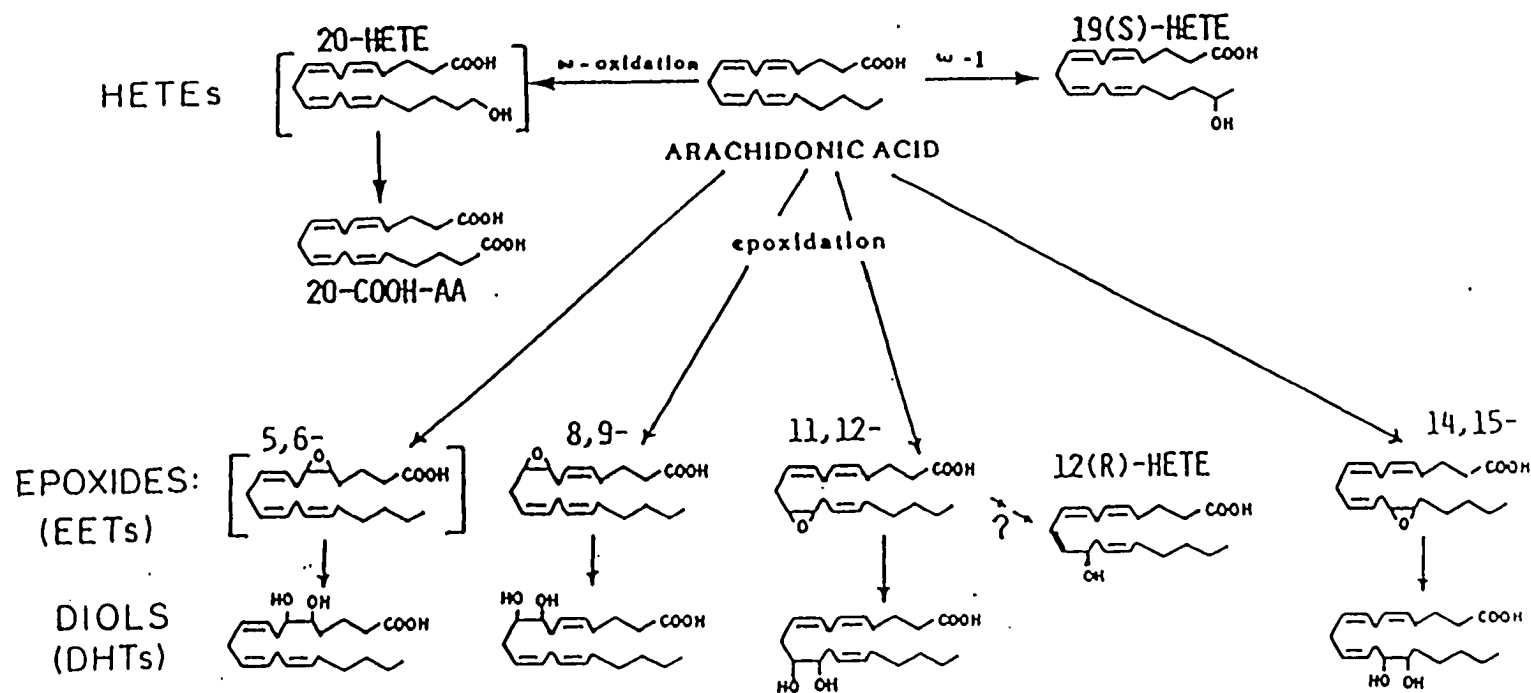


Figure 1.9. L'époxidation de l'acide arachidonique et les différents isomères produits.

(D'après McGiff, 1991)

régiospécificité des différents types de CYT P450 est encore mal comprise. On sait cependant que certains types de CYT P450 vont produire spécifiquement un certain isomère en plus grande quantité par rapport aux autres isomères. Ces époxydes ont diverses fonctions, dont la stimulation de la relâche de l'insuline et du glucagon au niveau du pancréas (Falck *et al.*, 1983), l'inhibition de l'activité cyclooxygénase (Fitzpatrick *et al.*, 1986), la vasoconstriction des artères rénales (Kato *et al.*, 1991), et la vasodilatation des artères mésentériques (Proctor *et al.*, 1987), cérébrales (Gedremedhin *et al.*, 1992), et coronaires (Pratt *et al.*, 1996). Au niveau des voies respiratoires, les différents isomères induisent, *in vitro*, différents taux de relaxation des muscles lisses des bronches contractés avec l'histamine (Zeldin *et al.*, 1995). Alors que 10 μ M de 5,6-EET induit 37% de relaxation des bronches contractées, le 8,9-EET induit une relaxation de 25%, le 11,12-EET n'induit qu'une très faible relaxation de 7%, et le 14,15-EET n'a aucun effet. Ces molécules sont beaucoup moins efficaces que le PGE₂, qui induit, dans les mêmes concentrations, une relaxation de 75%. Les EETs produits dans les différentes cellules sont ensuite rapidement hydrolysés par des époxydes hydrolases pour former les acides dihydroxyecosatriénoïques (DHETs) (Zeldin *et al.*, 1993), ou se lient à des phospholipides membranaires (Bernstrom *et al.*, 1992).

1.6 Contexte du projet

Comme mentionné précédemment, les différents régioisomères de l'acide époxyecosatriénoïque ont des effets au niveau des muscles lisses des voies respiratoires

(sauf le 14,15-EET). Comparativement à la relaxation induite par les EETs au niveau des muscles lisses vasculaires, le mécanisme de la relaxation qui est induit par ces molécules sur les MLVR n'a pas été étudié, ou du moins, n'a pas encore été rapporté dans la littérature. Au niveau vasculaire, cette relaxation se ferait par l'induction d'une repolarisation et d'une légère hyperpolarisation des cellules des muscles lisses. Ceci se ferait par l'activation des canaux potassiques de type K_{Ca} , par un mécanisme encore mal compris. Donc, si ceci est vrai, il peut être supposé que c'est également ce qui se passe au niveau du contrôle des MLVR. Nous avons donc émis l'hypothèse que les isomères de l'EET peuvent activer les canaux potassiques de type K_{Ca} présents dans la membrane plasmique des cellules des muscles de trachées ou de bronches. De plus, nous avons proposé que cette activation pourrait induire la relaxation des muscles lisses bronchiques, contractés par une stimulation cholinergique.

1.7 Objectifs du projet

Ce travail présente des résultats obtenus suite à la reconstitution de canaux potassiques de type K_{Ca} en bicouches lipidiques planes (BLP). Les canaux sont présents dans les vésicules dérivées des membranes de surfaces de cellule des muscles lisses de trachées de bœufs. Il ont été caractérisés à l'aide de différents tests biophysiques et pharmacologiques, et les résultats ont été comparés avec ce qui était déjà connu dans la littérature sur les canaux K_{Ca} de différents types de muscles lisses, des muscles squelettiques, et des neurones.

L'objectif principal de ce projet est de démontrer que les canaux potassiques de type K_{Ca} des MLVR sont activés par l'acide époxyeicosatriénoïque. À partir des résultats obtenus, le mécanisme d'action de la molécule a été étudié. La spécificité du groupement époxy des molécules d'EETs a aussi été étudiée en comparant les effets de l'EET avec d'autres lipides, dont l'acide arachidonique, son précurseur, et le platelet-activating factor (PAF). Comme les résultats au niveau vasculaire indiquent que les quatre isomères ont des effets semblables sur l'activité des canaux K_{Ca} , les effets d'un seul isomère, soit le 11,12-EET, ont été étudiés. Cet isomère est cependant celui qui présente les effets bronchorelaxants significatifs les plus faibles, comme présenté antérieurement. De plus, l'implication d'une protéine G dans l'activation des canaux K_{Ca} par le 11,12-EET a été étudiée. Les effets du 11,12-EET sur la tension des MLVR ont aussi été étudiés. Des expériences complémentaires réalisées dans le laboratoire ont récemment démontré les effets du 5,6-EET sur la tension des MLVR (Salvail *et al.* 1997).

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Préparation du matériel biologique pour les études de reconstitution membranaire

Les trachées fraîches de bœufs obtenues d'un abattoir local (Viandes Giroux, Bromptonville, Québec, Canada) étaient rapidement transportées au laboratoire dans une solution de McEven froide et oxygénée. La solution McEven a la composition suivante (en mM) : 130 NaCl, 5.4 KCl, 2.2 CaCl₂, 1 MgCl₂ et 10 HEPES, et le pH est ajusté à 7.4 avec le NaOH. On procède ensuite à la dissection du feuillet musculaire lisse dans la chambre froide (4°C) pour réduire la protéolyse (Kwan *et al.*, 1983). Une fois les trachées fixées, on enlève le tissu épithélial selon la méthode du laboratoire (Savaria *et al.*, 1992), en gardant toujours le tissu musculaire humide avec la solution de McEven. Le muscle lisse est ensuite disséqué du cartilage de la trachée et coupé en fins morceaux qui sont déposés dans une solution d'homogénéisation dont la composition est la suivante (en mM) : 300 sucrose, 20 K-PIPES, 4 K-EGTA, 2 DL-Dithiothreitol (DTT) et le pH est ajusté à 7.0 avec le KOH. Les inhibiteurs de protéases suivant ont aussi été ajoutés à la solution : 50mM Pefabloc [4-(2-Aminoethyl) benzene sulfonyl fluoride], 1.0 µM Pepstatine, 1.0 µM Leupeptine, 0.24 TUI / 100 ml Aprotinine. Le tissu est homogénéisé à l'aide d'un polytron (T25, Ultra-Turrax) deux fois à 8000 rpm, pendant 30 secondes chacune, et deux fois à 13500 rpm pendant 30 secondes chacune. Le polytron est nettoyé

entre chacune des homogénéisations avec la solution d'homogénéisation afin d'assurer son bon fonctionnement et pour récupérer la plus grande quantité de tissu possible. L'homogénat est ensuite centrifugé à 8500 rpm à 4°C pendant 20 minutes dans un rotor de type Ti-35 Beckman. Le surnageant est recueilli et filtré sur deux couches de mousseline avant d'être centrifugé à 33000 rpm à 4°C pendant 1 heure dans un rotor de type Ti-42.1 Beckman. Le culot est resuspendu dans une solution de cryopréservation de composition suivante (en mM) : 300 sucrose, 5 K-PIPES, et le pH est ajusté à 7.0 avec le KOH. La figure 2.1 résume les différentes étapes de la préparation des microvésicules. La fraction microsomale brute obtenue est aliquotée dans des microtubes (approximativement 100 µl / tube) et rapidement congelée dans l'azote liquide et placée à -85°C pour utilisation ultérieure. Une petite quantité de la solution microsomale brute est conservée pour fin de dosage protéique à l'aide de la méthode Folin-Ciocalteu (Lowry *et al.*, 1951).

2.2 Technique de reconstitution membranaire

La technique de reconstitution de microvésicules dans des bicouches lipidiques planes a été proposée par Miller et Racker (1976) pour l'étude des canaux ioniques. Le montage expérimental est composé d'un bain qui est divisé en deux chambres nommées *cis* et *trans*, où la chambre *cis* est celle à laquelle sont ajoutées les microvésicules. Le septum central qui divise les deux chambres est perforé d'un minuscule orifice de 200µm de diamètre. Avant l'expérimentation, cet orifice est prétraité avec une solution lipidique de composition phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS), et phosphatidylcholine (PC) dans un rapport 3 :2 :1, dont le solvant de dissolution est le

TRACHÉES

DISSECTION DU MUSCLE LISSE

FEUILLET MUSCULAIRE

HOMOGENÉISATION

HOMOGÉNAT

CENTRIFUGATION: 8500 rpm/20 min.

SURNAGEANT

CENTRIFUGATION: 33000 rpm/60 min.

FRACTION BRUTE

SURNAGEANT

Figure 2.1. Schéma qui résume les différentes étapes de la préparation de la fraction microsomale brute pour les expériences de reconstitutions membranaires.

chloroforme. Les chambres contiennent une solution de composition suivante: 50 mM KCl, 20 mM K-HEPES, et $10\mu\text{M Ca}^{2+}$ libre ($109\mu\text{M CaCl}_2 + 100\mu\text{M K-EGTA}$), et le pH est à 7.4, à la température de la pièce ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). La membrane est peinte avec un bâtonnet de teflon, dans cette solution, avec l'application d'une goutte de solution lipidique de même composition que la solution de prétraitement mais dont les lipides sont dissous dans le décane. Les BLP utilisées ont une capacité comprise entre 200 et 400 pF, capacité qui est mesurée par l'application d'une onde carrée de 0.2 mV à 25 ms d'intervalle. Lorsqu'une membrane a une capacité satisfaisante, on injecte des quantité d'environ 7 μl de la préparation microsomale brute, dont la concentration se situe entre 10 et 15 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$, dans la chambre *cis*. Pour faciliter la fusion des microvésicules, un gradient de concentration de KCl est établi entre les chambres *cis* / *trans* (250/50 mM KCl). La fusion se produit de façon aléatoire lorsqu'une microvésicule fusionne avec la membrane artificielle. Selon les besoins, on peut, suite à une fusion, éliminer le gradient de concentration en augmentant la concentration KCl de la chambre *trans* à 250 mM, et ceci peut réduire la probabilité d'autres fusions. Il est possible de mesurer les courants produits par les canaux qui ont été reconstitués avec la microvésicule à l'aide de deux électrodes de basse résistance (50 Ω). L'électrode de la chambre *cis* est reliée à un préamplificateur de type DAGAN (modèle 8900, Dagan Corp., Minneapolis, MN, USA), alors que l'électrode de la chambre *trans* est reliée à la terre virtuelle (figure 2.2). Les signaux sont filtrés à 10 kHz et sont parallèlement visualisés sur un oscilloscope, et sur un ordinateur, et enregistrés sur un magnétoscope (DAS/VCR 900 Toshiba, Unitrade). Dans le but d'analyser les

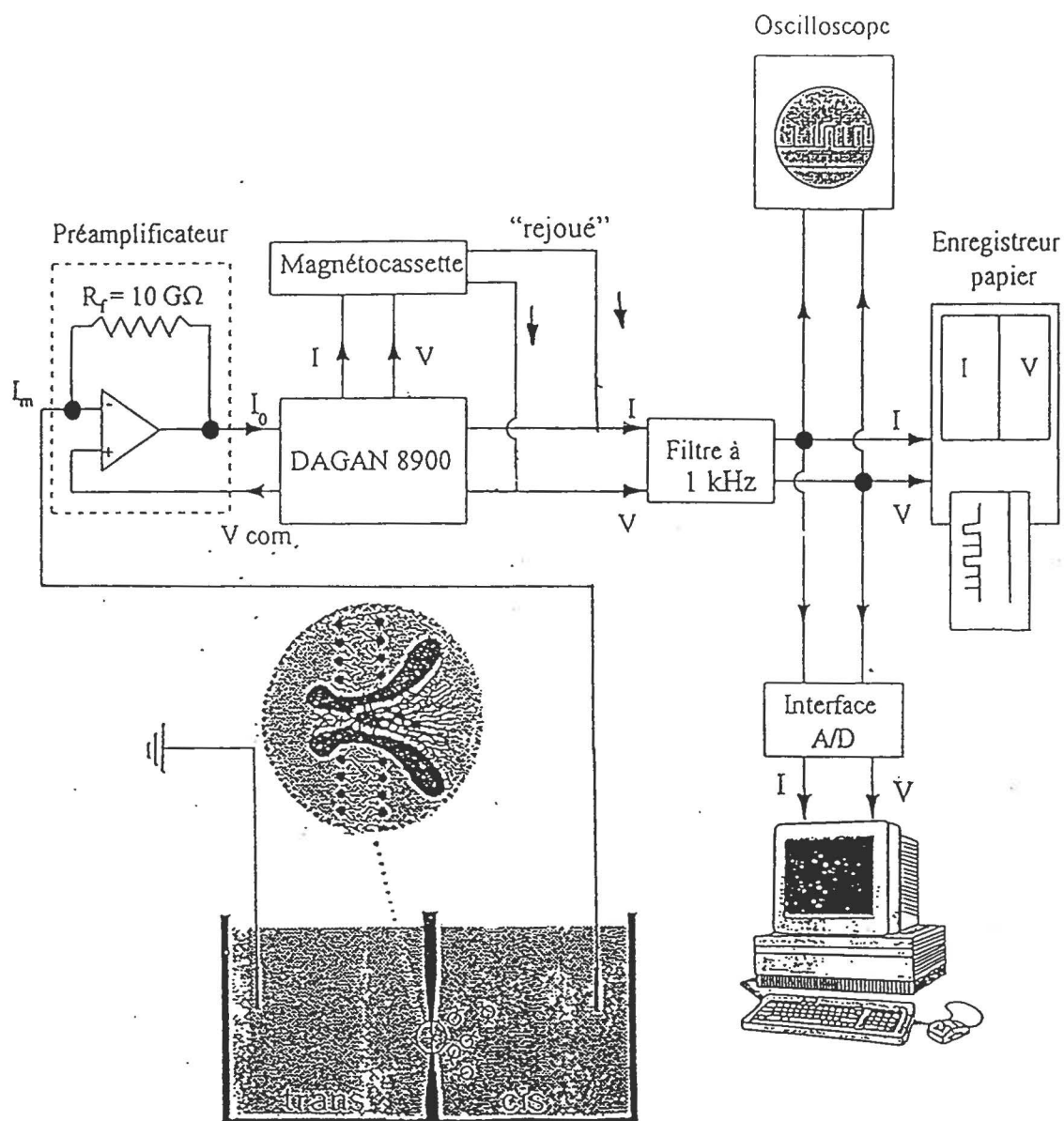


Figure 2.2. Schéma du montage expérimental utilisé pour les reconstitutions membranaire.

signaux enregistrés, ces derniers sont rejoués, filtrés à 1 kHz par un filtre passe-bas (8-pole Bessel, LPF-100, Warner Instrument Corporation, Handen, CT, USA), et imprimés par un enregistreur sur papier (DASH II MC), ou sont digitalisés à l'aide d'une interface analogue / digitale (A/D) (TL1-M, Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) à une fréquence d'échantillonnage de 5 kHz, correspondant à 5 fois la fréquence de coupure du filtre. Les signaux digitalisés sont copiés sur un disque rigide de l'ordinateur PC (HP Vectra, QS 16-386) à l'aide du logiciel Axotape (Axone-Instrument Inc., Foster City, USA).

2.2.1 Analyse des courants

Les signaux digitalisés et copiés en filières de 2 minutes sont analysés à l'aide programme informatique (SCA) développé par le Dr. Mark T. Nelson (U. of Vermont, VT, USA). Ce programme permet d'évaluer la probabilité d'ouverture (P_o) des canaux à l'aide d'histogrammes d'amplitude, ainsi que les temps d'ouvertures (t_o) et de fermetures (t_f) à partir d'histogrammes de distribution. La P_o d'un canal est déterminée par la somme des périodes de temps de l'état ouvert du canal par rapport à la somme totale des périodes d'ouvertures et de fermetures, dont l'équation est la suivante :

$$P_o = \frac{a_1}{a_0 + a_1}$$

où a_0 et a_1 représentent les aires de l'histogramme d'amplitude de courant des états fermés et ouverts du canal, respectivement (voir figure 2.3). Les différentes aires de l'histogramme sont déterminées par une distribution gaussienne. Lorsque plusieurs canaux sont reconstitués par une même microvésicule ou suite à plusieurs fusions, le calcul de la NPo (où N représente le nombre de canaux) est fait selon l'équation suivante :

$$NPo = \frac{(a_1 + 2a_2 + 3a_3 + \dots + na_n)}{(a_0 + a_1 + a_2 + a_3 + \dots + a_n)}$$

où a_0 , a_1 , a_2 , a_3 , ..., et a_n représentent l'aire de l'histogramme d'amplitude correspondant à l'état fermé (a_0) et les aires où un seul (a_1), deux (a_2), trois (a_3), ou n (a_n) canaux sont ouverts simultanément (Fig 2.3). Puisque le nombre de fusions et le nombre de canaux par microvésicules sont aléatoires, il est possible de normaliser la NPo en divisant le résultat par le nombre de canaux actifs (N) observés durant l'enregistrement.

2.2.2 Études pharmacologiques

Des études pharmacologiques ont été effectuées sur des canaux de type K_{Ca} qui ont été reconstitués. Les canaux ont été caractérisés en fonction du voltage appliqué et en fonction de la concentration de calcium libre cytoplasmique ($[Ca^{2+}]_{trans}$), où le côté cytoplasmique est désigné comme étant la chambre *trans* pour simplifier la description. Cependant, en analysant le comportement du canal en fonction du voltage appliqué et en fonction de $[Ca^{2+}]_{trans}$, il a été remarqué que ce n'était vraiment pas se qui se passait dans

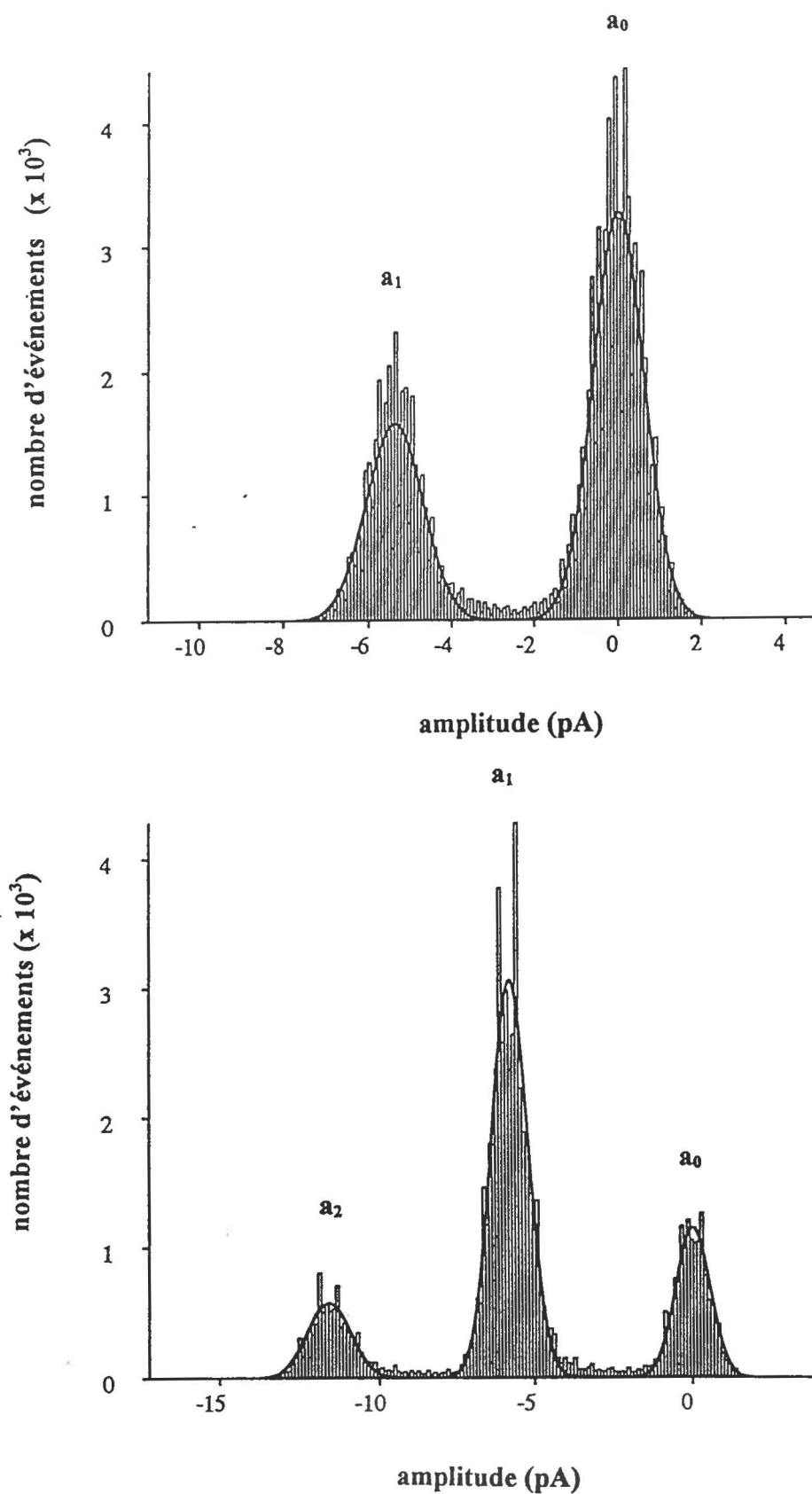


Figure 2.3. Histogrammes d'amplitudes obtenus par l'analyse d'un seul canal (A), et de deux canaux (B), à -20 mV. À 0 pA, les canaux sont dans leur état fermé.

100% des fusions, c'est-à-dire que plusieurs canaux semblaient être inversés. Donc, avant d'évaluer les effets d'un composé pharmacologique, on tient compte de l'orientation des canaux présents en évaluant les caractéristiques connues du canal. Le tétraéthylammonium (TEA), un bloqueur des canaux K^+ , et l'ibériotoxine (IbTX), un bloqueur très spécifique des canaux K_{Ca} , ont aussi été utilisés pour caractériser ce type de canal.

Connaissant les signaux produits par le canal qui nous intéresse (K_{Ca}), il est possible d'évaluer les effets d'un composé pharmacologique. L'acide époxyeicosatriénoïque-11,12 (11,12-EET) est une molécule très sensible à l'oxygène et à la lumière, ainsi qu'à la chaleur. Alors, les manipulations de la solution 11,12-EET dans l'éthanol (solvant) sont très délicates. La solution est conservée sous argon à -85°C dans un tube qui empêche la lumière de pénétrer. Pour l'expérimentation, une seringue Hamilton est utilisée pour injecter une concentration déterminée de 11,12-EET dans une des chambres. L'agitation avec des barreaux magnétiques placés dans les chambres est importante pour bien homogénéiser la solution ajoutée. Les NPo calculées après l'addition du 11,12-EET ont été divisées par les NPo témoins dans le but d'évaluer le facteur d'activation de la molécule sur des canaux de NPo variées. En plus du 11,12-EET, le solvant de la solution (éthanol) a aussi été évalué, ainsi que l'AA et le PAF, dans le but de confirmer l'effet du 11,12-EET et de savoir si l'époxy, sur la molécule 11,12-EET, était important pour activer les canaux K_{Ca} . Et finalement, le GTP et le GTP γ S ont été utilisés pour étudier l'implication d'une protéine G dans la régulation des canaux K_{Ca} reconstitués.

2.3 Préparation des fragments de bronches de cobayes

Les cobayes mâles (Hartley, 300-350 g) sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'une dose de pentobarbital de sodium de 50 mg / kg du poids corporel, puis sacrifiés par exsanguination. Les poumons, les bronches et la trachée sont prélevées immédiatement après la mort de l'animal et mis dans une solution de Krebs oxygénée de composition suivante (en mM) : 118.1 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂, et 11.1 glucose, le pH est à 7.4. Par la suite, les bronches principales sont coupées en spirales (Cadieux *et al.*, 1990) et les cellules épithéliales (CE) sont enlevées mécaniquement avec un coton-tige dans certaines bronches pour éliminer la barrière physique qui sépare le muscle lisse et le composé pharmacologique utilisé (11,12-EET). Pour les études pharmacologiques, les fragments de bronches, avec ou sans épithélium, sont placés dans les bains à organe isolé de 5 ml et baignent dans une solution de Krebs oxygénée à l'aide d'un mélange gazeux composé de 95% O₂ - 5% CO₂ et maintenue à 37 °C. Les tissus sont soumis à une tension initiale (1 gramme) par un transducteur de force (Grass, modèle FT 03C), qui sera la tension de base, puis stabilisés dans la solution Krebs pendant 60 minutes avec des lavages aux 15 minutes (Savaria *et al.*, 1992), avant l'expérimentation.

2.4 Mesures de tensions musculaires isométriques

La tension initiale des muscles lisses et le changement de tension lors de différents

tests pharmacologiques sont mesurés par le transducteur de force auquel est relié une des extrémités des bronches. Les signaux, transformés en variations de voltage par le transducteur, sont amplifiés et enregistrés sur un polygraphe Grass (modèle 7D), tel que décrit dans la littérature (Cadieux *et al.*, 1990). Les expérimentations ont été divisées en deux groupes, soit avec l'utilisation du 11,12-EET dilué dans l'éthanol (EtOH), et l'utilisation de la molécule diluée dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). Dans un groupe d'expérience, celui avec l'éthanol, deux préparations de bronches sont utilisées, soient des bronches intactes, avec la couche épithéliale, et des bronches dont nous avons enlevé l'épithélium. Le deuxième groupe d'expériences (DMSO) est effectué avec des bronches sans épithélium seulement. Pour chacune des expériences, les bronches sont précontractées avec 0.2 μ M carbamylcholine (CCh), et lorsque la contraction a atteint un plateau, différentes concentrations de 11,12-EET sont ajoutées aux bains d'organes. Deux lavages successifs sont ensuite effectués à 15 minutes d'intervalle, pour éliminer le CCh, et éliminer la contraction, et par la suite, la même concentration de CCh est ajoutée pour l'expérience témoin avec l'EtOH ou avec le DMSO.

Les relaxations induites par les solutions de 11,12-EET et par les solvants sont ensuite calculées en pourcentage (%) de relaxation par rapport à l'amplitude de la contraction, par l'équation suivante :

$$\% \text{ relaxation} = \frac{\text{tension en présence de } 2\mu\text{M CCh} + 11,12\text{-EET ou solvant}}{\text{tension en présence de } 2\mu\text{M CCh}} \times 100$$

2.5 Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en terme de valeurs moyennes \pm écart-type. La variance statistique est évaluée à l'aide du test t de Student, pairé ou non-pairé, selon le cas, en utilisant le logiciel Sigma-Plot (SPSS Inc., Chicago, IL). La valeur de $P < 0.05$ est considérée significative.

2.6 Réactifs chimiques

Le Pefabloc a été obtenu chez Boehringer Mannheim (Laval, Qc). Le $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -tartrate, et le CuSO_4 ont été achetés de Fisher Scientific (Nepean, Ont). Le phosphatidyléthanoline, le phosphatidylsérine et le phosphatidylcholine ont été achetés chez Avanti Polar Lipid, Alabaster, AL. Le décane, le tétraéthylammonium, le 11,12-EET, l'acide arachidonique, le dérivé du platelet-activating factor, le GTP et le $\text{GTP}\gamma\text{S}$, le carbamylcholine et le DMSO, la pepstatine, la leupeptine, le DTT, et l'aprotinine ont été obtenus de Sigma, Chemical, Co, St-Louis, MO. Le Folin B et le Folin A, une solution de Na_2CO_3 , NaOH , ont aussi été achetés chez Sigma. L'éthanol a été acheté chez Les Alcools de Commerces Inc, Montréal, Qc. L'ibériotoxine a été obtenu de Alomone Lab., Jérusalem, Israël.

3. RÉSULTATS

3.1 Mesures de courants unitaires médiés par les canaux K_{Ca}

3.1.1 Canaux potassiques et chlores reconstitués

La figure 3.1 représente le type de traces qu'on observe régulièrement en reconstitution membranaire avec des microvésicules de cellules de muscles lisses de trachées de bœufs. L'enregistrement montre deux types de courants unitaires produits par deux canaux différents. Par les caractérisations antérieures, on sait que le canal de grande conductance est le canal K^+ de type K_{Ca} , alors que le canal de petite conductance est un type de canal Cl^- , insensible au calcium (Salvail *et al.*, 1996). Cependant, ces deux types de canaux ne sont pas toujours reconstitués ensemble, dans une même microvésicule, et les canaux de type K_{Ca} sont observés plus fréquemment que les canaux Cl^- .

3.1.2 Caractérisations électrophysiologique et pharmacologique des canaux K_{Ca}

Le graphique représentant les courbes courant / voltage à la figure 3.2 montre les résultats qui sont observés et évalués dans toutes les expériences effectuées avec les canaux K_{Ca} . La pente de ces courbes représente la conductance (γ) des canaux. La courbe qui montre les courants unitaires moyens obtenus en condition asymétrique présente un potentiel d'inversion (E_K) pour le K^+ à -40 mV. La courbe qui représente les courants obtenus en condition symétrique présente un potentiel d'inversion à 0 mV. Ces potentiels d'inversion représentent les voltages auxquels le flux net de K^+ , entre les deux chambres,

A + 40 mV, 250/250 KCl *trans/cis*, 10 μ M (Ca^{2+})_{trans} libre

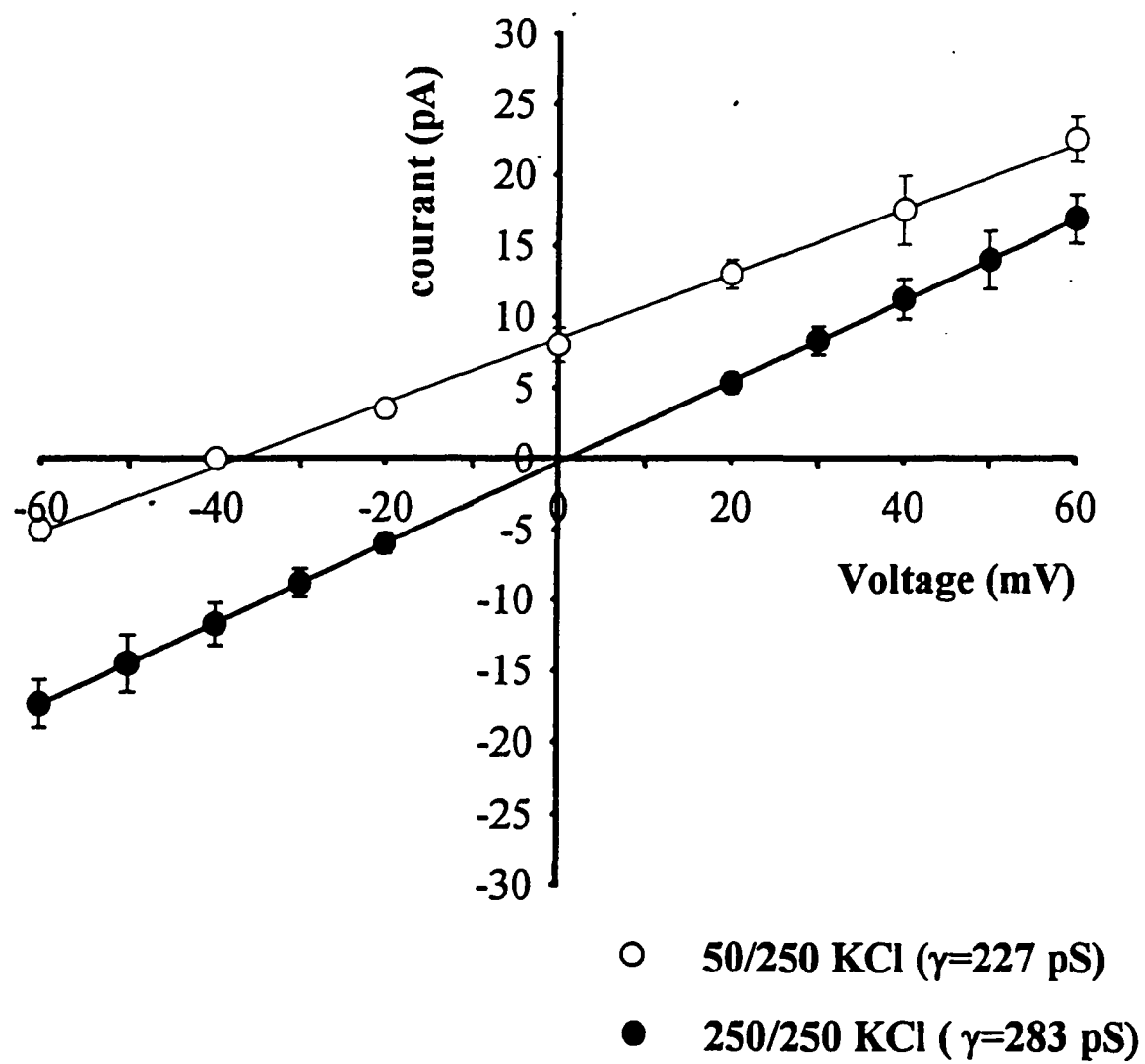


B 250/250 KCl *trans/cis*, +40 mV, 0.6 μ M (Ca^{2+})_{trans} libre 200 ms



Figure 3.1. Enregistrement représentant deux types de canal ionique (Cl^- et K^+) en condition symétrique (250 / 250 KCl *trans / cis*), à +40 mV et à deux concentrations de Ca^{2+} libre intracellulaire. **A** : courant produit par un petit canal Cl^- très actif et un canal K^+ de grande conductance (K_{Ca}) très actif, à 10 μ M Ca^{2+} libre intracellulaire. **B** : courant produit par les deux mêmes canaux mais à 0.6 μ M Ca^{2+} libre intracellulaire. Le canal K^+ est sensible à la concentration de Ca^{2+} , alors que le canal Cl^- est toujours très actif à faible concentration de Ca^{2+} . Le niveau où les canaux sont fermés (C) et l'amplitude du courant produit par chacun des canaux sont représentés à la gauche des traces.

Figure 3.2. Courbes représentant le courant unitaire en fonction du voltage des canaux K^+ des MLVR bovins de type K_{Ca} reconstitués dans des bicouches lipidiques planes, en conditions asymétrique de 50 / 250 mM KCl *trans* / *cis* (n=10) et symétrique de 250 / 250 mM KCl *trans* / *cis* (n=6). La pente des courbes représente la conductance moyenne (γ) des canaux, en picoSiemens (pS), dans les deux conditions.



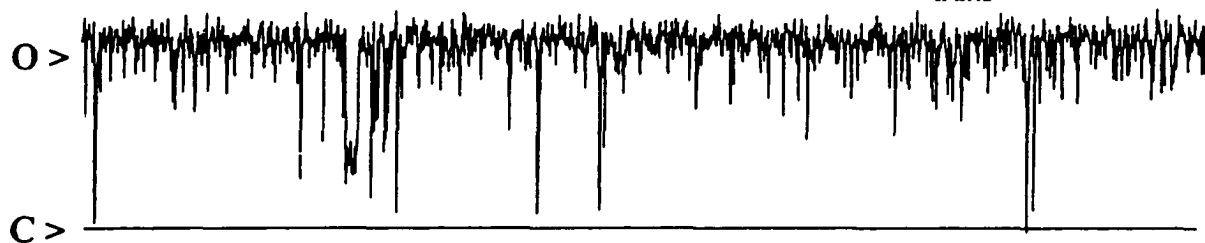
est nul. Ceci ne veut pas dire que le canal est fermé ou inactivé, au contraire, le canal K_{Ca} est très actif à 0 mV, mais un peu moins actif à -40 mV.

Le comportement des canaux K_{Ca} en fonction du voltage est décrit par la figure 3.3, où la probabilité d'ouverture (P_o) des canaux est calculée à différents voltages. Les traces sont très représentatives de ce qui est observé généralement à différents voltages. À + 60 mV la P_o est très élevée, c'est-à-dire que le canal est plus souvent dans son état ouvert que dans son état fermé. Lorsque le voltage est diminué et se rapproche de 0 mV, l'amplitude de courant est diminuée, comme montré à la figure 3.2, mais aussi, la P_o du canal est considérablement diminuée. En condition symétrique, le potentiel d'inversion étant à 0 mV, on observe un courant qui est inversé à des voltages négatifs, dont l'amplitude est augmentée vers des voltages qui s'éloignent du E_K , mais dont la P_o du canal diminue toujours vers les voltages plus négatifs. Les courbes de P_o en fonction du voltage montrent des valeurs qui sont bien décrites par une fonction de Boltzmann (voir équation dans la légende de la Fig. 3.3). Par contre, les deux courbes montrent que les P_o sont beaucoup moins élevées lorsque la $[Ca^{2+}]_{trans}$ est plus faible. La $V_{1/2}$ passe de -42 mV en présence 10 μM Ca^{2+} , à +26 mV en présence de 2 μM Ca^{2+} .

La dépendance au voltage a été montrée par Savaria *et. al.* (1992), dans le même laboratoire (Fig. 3.4). Les expériences avaient cependant été effectuées avec des bicouches lipidiques formées du lipide 1-2 bis (oleoyloxy)- 3(triméthylammonio) propane (DOTAP), que nous avons remplacé par le phosphatidylsérine (PS). L'utilisation du

Figure 3.3. Comportement du canal K^+ reconstitué en bicouche lipidique plane en fonction du voltage. **A** : courant unitaire à différents voltages. Les traces sont obtenues dans un tampon KCl 250mM *trans* / 250 mM *cis*, à 10 μ M Ca^{2+} libre en *trans*, pH 7.4. **B** : dépendance au voltage de la P_o de plusieurs canaux K^+ en condition symétrique à deux concentrations de Ca^{2+} *trans*. Les résultats expérimentaux ont été ajustés avec une équation de Boltzmann : $P_o = 1 / (1 + \exp [-(V_m - V_{1/2}) / K])$; où V_m représente le voltage, $V_{1/2}$ représente le voltage auquel la P_o est 0.5, estimé à -42 mV à 10 μ M Ca^{2+} et +26 mV à 2 μ M Ca^{2+} , et $K = 13.94$. Dans cette figure et dans toutes les figures, les états ouverts et fermés des canaux sont représentés par O et C, respectivement, à la gauche des traces.

A +60 mV, 250/250 mM KCl *trans/cis*, 10 μ M $(\text{Ca}^{2+})_{\text{trans}}$ libre



+20 mV

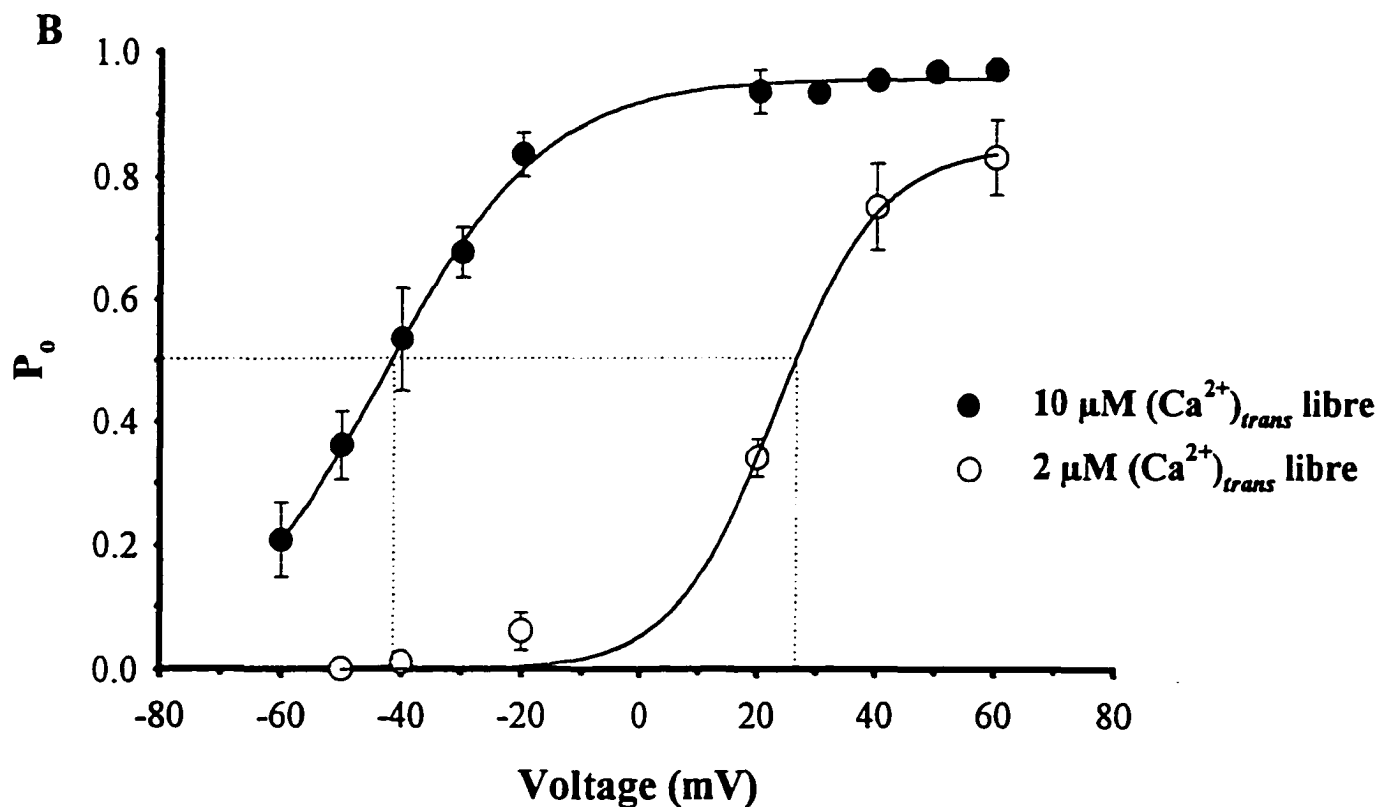


-20 mV



5 pA
100 ms

-60 mV



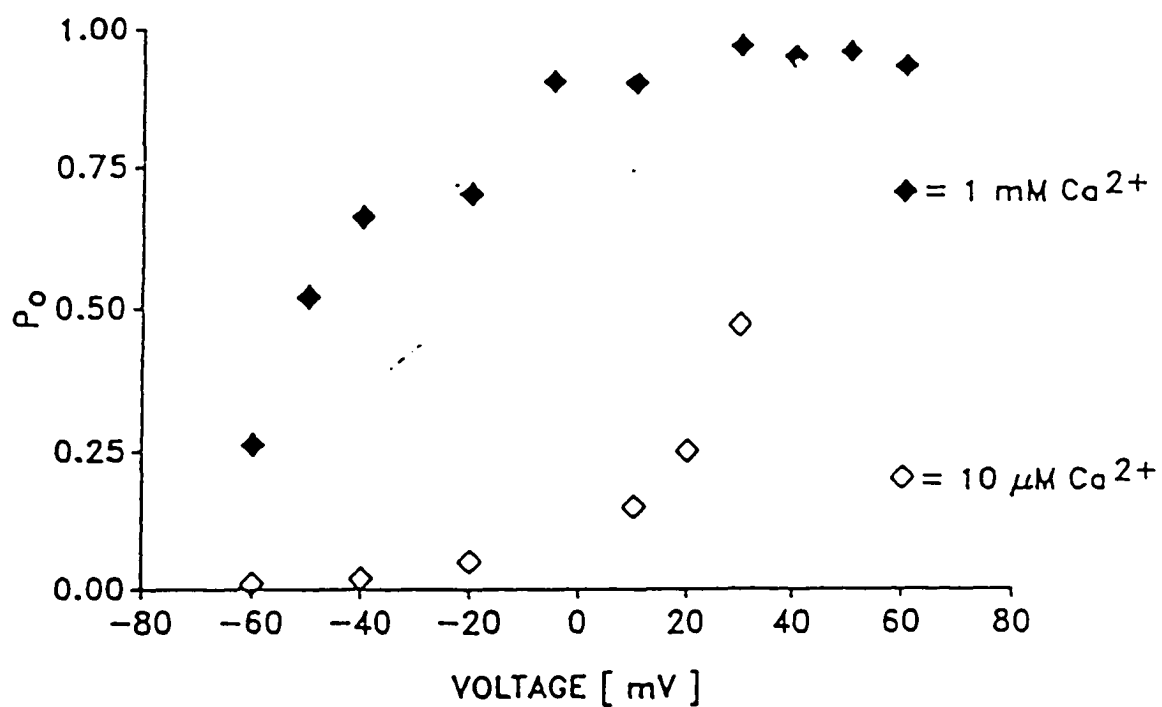


Figure 3.4 . Dépendance au voltage de l'activité des canaux K_{Ca} à 1 mM et 10 μM Ca^{2+} libre cytoplasmique. Les résultats ont été obtenus en condition symétrique (150 mM K-gluconate *trans* / *cis*), et où le phosphatidylsérine (PS) a été remplacé par le DOTAP pour la formation des bicouches lipidiques. Tiré des travaux de Savaria *et al.* (1992).

DOTAP a montré que les canaux devaient être en présence de beaucoup plus de Ca^{2+} cytoplasmique pour présenter des valeurs de P_o comparables à ce qui est montré à la figure 3.3. Les valeurs de P_o obtenues à $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} présentées dans ce travail étaient de l'ordre des valeurs obtenues par Savaria *et. al.* (1992) en présence de 1 mM de Ca^{2+} , soit une concentration 100 fois moins élevée.

La sensibilité au Ca^{2+} libre cytoplasmique ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{trans}}$) est montrée à la figure 3.5. La figure montre que lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{trans}}$ est diminuée, les canaux sont beaucoup moins actifs. Le senseur de Ca^{2+} est du côté cytoplasmique et aucun senseur de Ca^{2+} n'est présent du côté extracellulaire. Le graphique qui présente la P_o en fonction de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{trans}}$ libre montre la sensibilité des canaux K_{Ca} au Ca^{2+} , à plusieurs concentrations. Les résultats sont bien décrits par une équation de Hill (voir équation Fig. 3.5), dont le coefficient de Hill (n) est de 2.81, et la concentration de Ca^{2+} où le canal est à $P_{o,0.5}$ est de $0.85 \mu\text{M}$. À ce voltage (+20 mV), la courbe atteint un plateau à environ $4 \mu\text{M}$ Ca^{2+} , une concentration où les canaux sont à leur valeur d'activation maximale. À des concentrations plus faibles que $2 \mu\text{M}$ Ca^{2+} , la courbe décroît brusquement, ce qui veut dire qu'à ces valeurs (de $2 \mu\text{M}$ à environ $0.4 \mu\text{M}$), un léger changement de concentration de Ca^{2+} affecte considérablement l'activité des canaux K_{Ca} .

Suite à cette caractérisation des canaux K_{Ca} par leurs conductances et leurs sensibilités au voltage et à la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{trans}}$ libre, des caractérisations pharmacologiques ont été effectuées. Premièrement, un bloqueur de canaux K^+ , le TEA, plus ou moins spécifique

Figure 3.5. Sensibilité au Ca^{2+} libre cytoplasmique des canaux K^+ de grande conductance des MLVR bovins. **A** : enregistrement de plusieurs canaux reconstitués en BLP à différentes concentrations de Ca^{2+} libre cytoplasmique. Les traces ont été obtenues à +20 mV, en condition symétrique (250/250 mM KCl *trans* / *cis*). La $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{trans}}$ a été diminuée graduellement par l'addition de concentrations cumulatives de EGTA. **B** : dépendance de la P_o des canaux K_{Ca} en fonction du changement de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{trans}}$ à +20 mV. Les résultats expérimentaux ont été ajustés avec l'équation de Hill : $P_o = (P_{o_{\text{max}}} [\text{Ca}^{2+}]^n) / (K_d + [\text{Ca}^{2+}]^n)$; où K_d représente la $[\text{Ca}^{2+}]$ où les canaux sont activés à la moitié de leurs valeurs maximales. Les résultats en **B** représentent la moyenne \pm écart-type de $n = 3$ à 5 expériences.

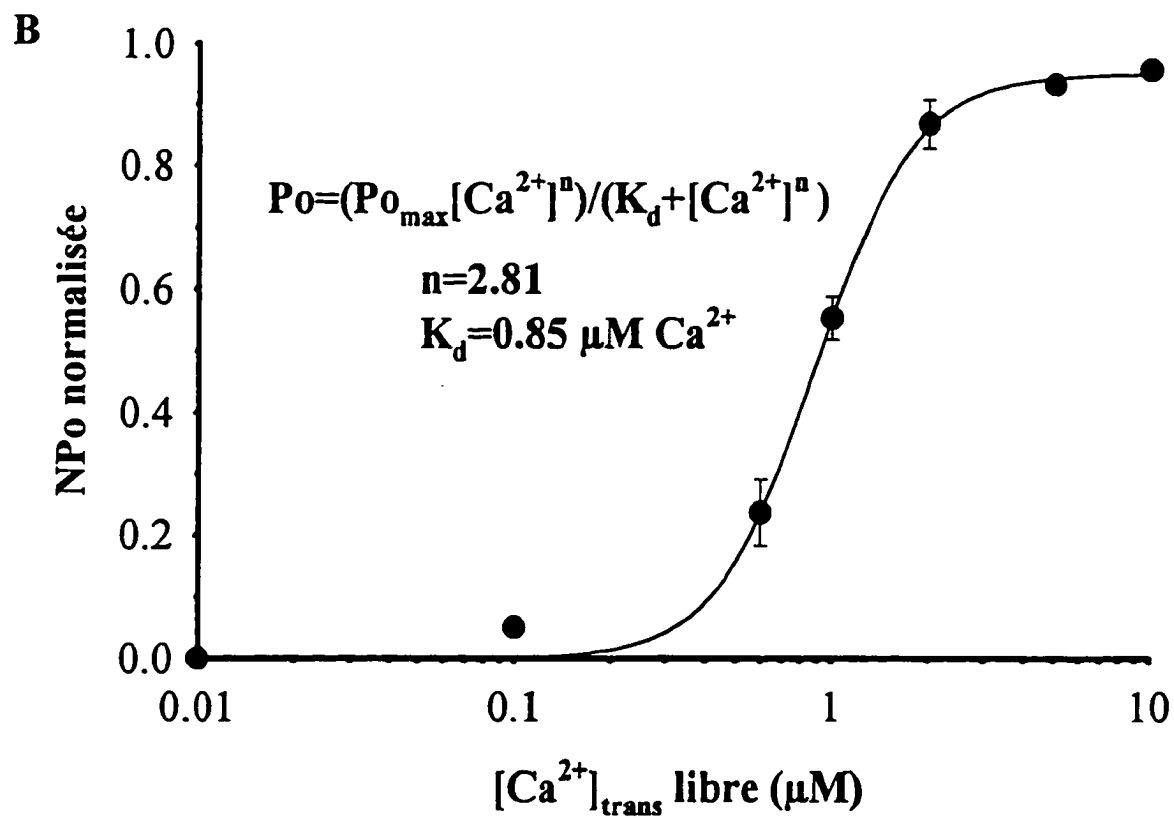
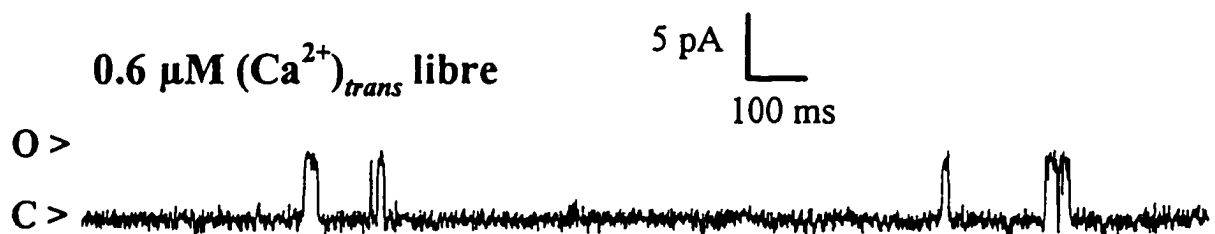
A $10 \mu\text{M } (\text{Ca}^{2+})_{\text{trans}}$ libre, 250/250 mM KCl *trans/cis*, +20mV



$2.0 \mu\text{M } (\text{Ca}^{2+})_{\text{trans}}$ libre



$0.6 \mu\text{M } (\text{Ca}^{2+})_{\text{trans}}$ libre



pour les canaux K_{Ca} , a été utilisé pour la caractérisation et présenté à la figure 3.6. L'addition de ce bloqueur dans la chambre *cis* (extracellulaire) a montré un effet sur la conductance des canaux. Les canaux avaient, en contrôle, une conductance moyenne de 260 pS, et la présence du TEA a provoqué la diminution de cette conductance à une valeur moyenne de 110 pS, soit une conductance 50 % plus faible.

L'ibérotisine (IbTX) a aussi été utilisée pour la caractérisation pharmacologique des canaux K_{Ca} . L'IbTX est un bloqueur très spécifique de ce type de canal. Des résultats représentatifs de l'effet du bloqueur sur l'activité des canaux K_{Ca} sont montrés à la figure 3.7. À partir de canaux très actifs, conditions témoin, comme présenté dans cette figure, l'IbTX a été ajouté du côté *cis* ; la toxine, à une concentration de 0.01 μ M, inhibe presque totalement la P_o des canaux ($P_o < 0.005$). Contrairement au TEA, l'IbTX n'affecte pas la conductance des canaux mais seulement la P_o .

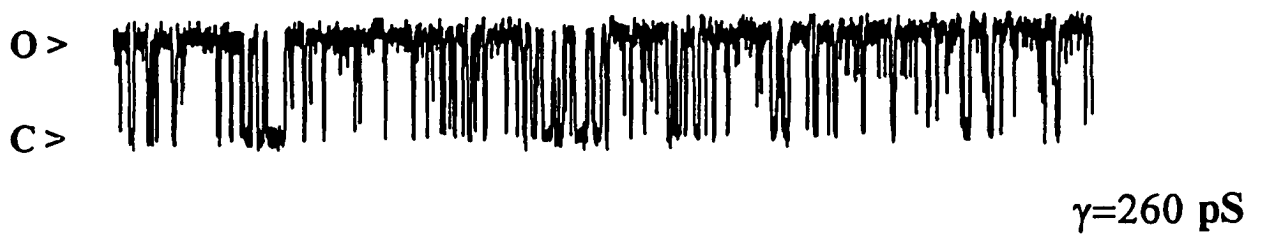
3.1.3 Effets du 11,12-EET sur les canaux K_{Ca}

Suite à cette caractérisation des canaux K_{Ca} , les effets du 11,12-EET ont été étudiés. La figure 3.8 présente les résultats obtenus de l'effet produit par le 11,12-EET exogène dilué dans l'éthanol sur la P_o des canaux K_{Ca} . Pour simuler le relâchement de la molécule par les cellules épithéliales sur le muscle lisse de trachée, la solution a été ajoutée du côté *cis*. Comme le montre l'enregistrement, les deux canaux reconstitués qui étaient peu actifs à faible $[Ca^{2+}]_{trans}$ libre ont été réactivés par la présence de la molécule du côté extracellulaire. Plus la concentration présente est élevée, plus les

Figure 3.6. Effet du TEA sur les canaux K_C reconstitués en bicouches lipidiques planes.

A : enregistrement, en contrôle, d'un seul canal, en condition asymétrique, à 0 mV et à 10 μ M Ca^{2+} libre cytoplasmique. Le canal présente une conductance de 260 pS. **B** : effet de l'addition de 100 μ M TEA (n=3) dans la chambre *cis* (extracellulaire).

A contrôle: 0 mV, 50/250 mM KCl *trans/cis*, 10 μ M (Ca²⁺)_{*trans*} libre



10 pA

200 ms

B +100 μ M TEA *cis*



Figure 3.7. Effet de l'IbTX sur l'activité des canaux de type K_{Ca} reconstitués en bicouches lipidiques planes. **A** : enregistrement en contrôle, où la P_o moyenne des canaux est 0.87 à +20 mV et à 10 μ M Ca^{2+} libre cytoplasmique. **B** : Effet de l'addition de 0.01 μ M IbTX du côté *cis* (extracellulaire). La toxine inhibe l'activité des canaux. (Observé dans n=3 expériences).

A contrôle: +20 mV, 250/250 mM KCl *trans/cis*, 10 μ M (Ca²⁺)_{trans} libre



Po=0.87



5 pA

200 ms

B + 0.01 μ M IbTX *cis*



Po<0.005

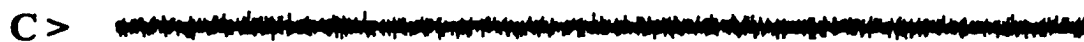
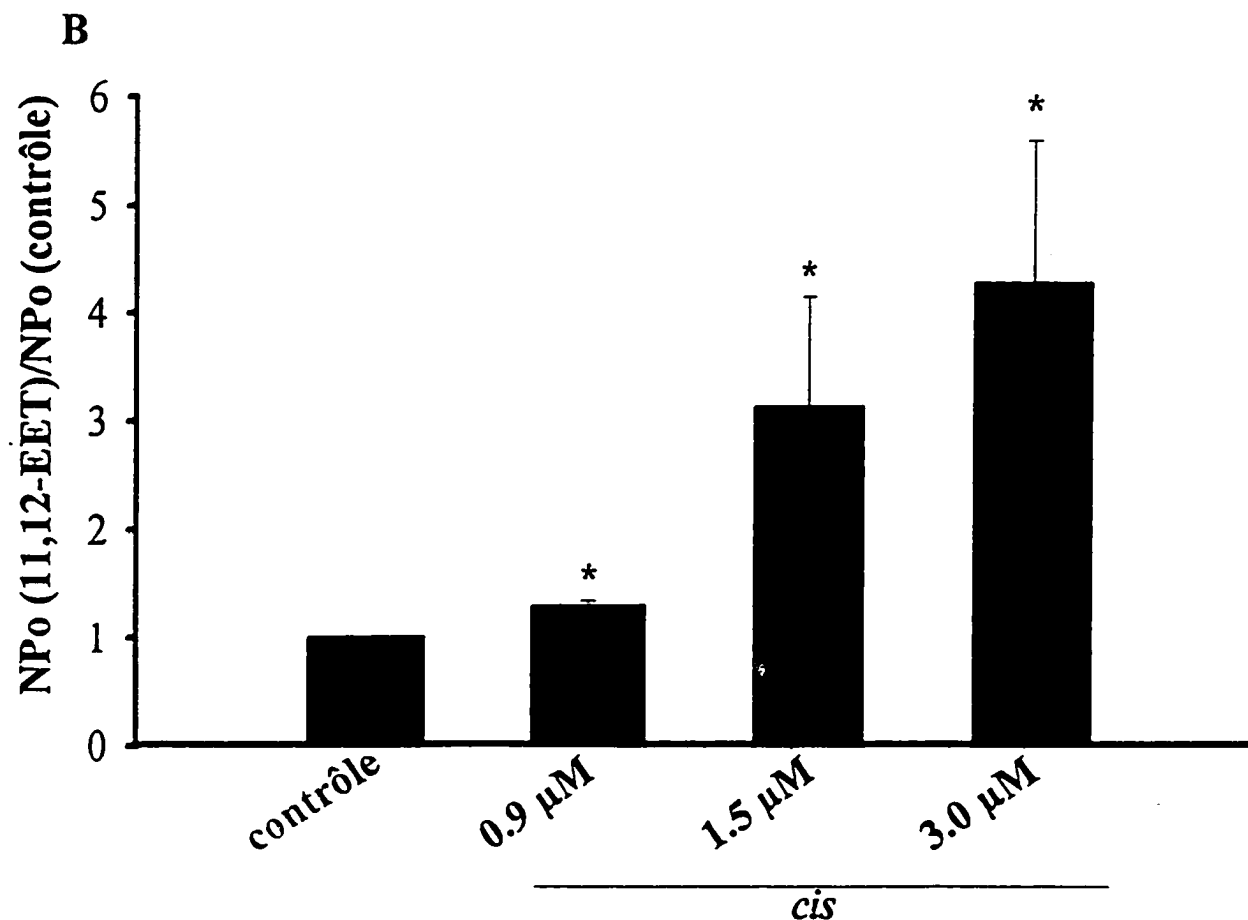


Figure 3.8. Effet du 11,12-EET exogène ajouté du côté *cis* (extracellulaire) sur l'activité des canaux K_{Ca} de trachées de bœufs et reconstitués en bicouches lipidiques planes. **A :** enregistrement représentatif représentant l'activité de trois canaux K_{Ca} reconstitués, en contrôle, et après l'addition cumulative de différentes concentrations de 11,12-EET *cis*. **B :** graphique représentant la moyenne de l'effet du 11,12-EET à différentes concentrations. Les valeurs sont représentées par la division de la NPo des canaux à différentes concentrations ($n=3$ à 6), par la NPo en contrôle, c'est-à-dire, lorsqu'il n'y avait pas de 11,12-EET présent. * signifie que la valeur est significativement plus grande qu'en contrôle.

A **contrôle**: +20mV, 250/250 mM KCl, *trans/cis*, 0.6 μM (Ca^{2+})_{*trans*} libre



0.9 μM 11,12-EET *cis*

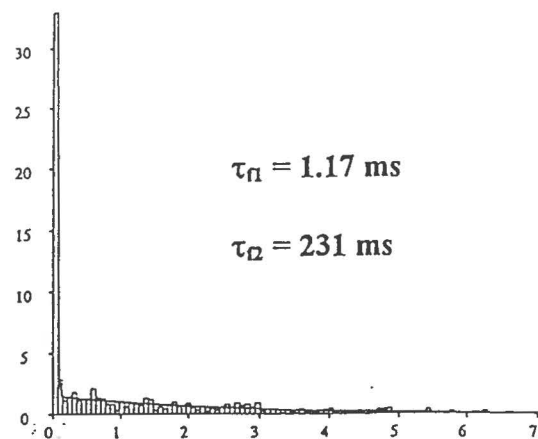
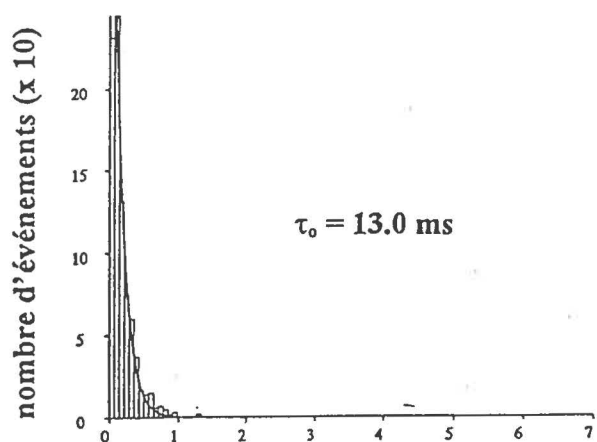


canaux sont actifs. Comme présenté sur l'histogramme, les résultats de plusieurs expériences montrent que $0.9 \mu\text{M}$ de 11,12-EET augmente de façon significative la P_o des canaux. La concentration de $0.9 \mu\text{M}$ est la concentration la plus faible qui cause une augmentation significative de la P_o des canaux K_{Ca} . Une concentration de $3 \mu\text{M}$, la plus haute concentration étudiée en laboratoire, multiplie par 4, en moyenne, la P_o des canaux.

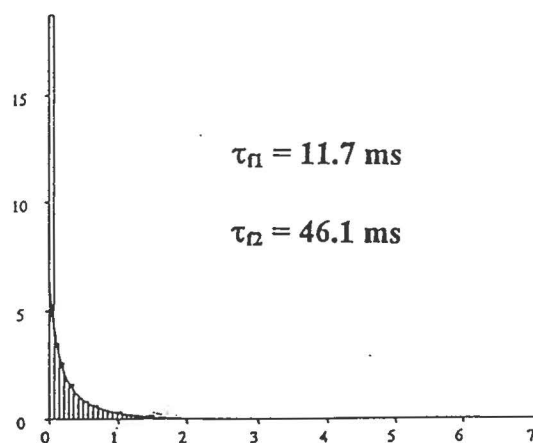
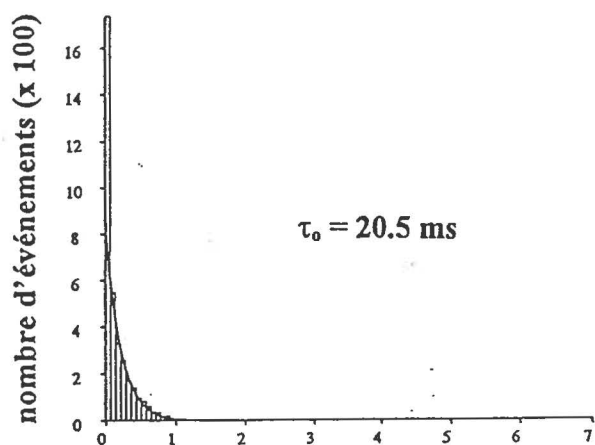
La mesure des constantes de temps d'ouverture (τ_o) et de fermeture (τ_f) a été effectuée à l'aide d'un logiciel d'analyse pour bien voir les effets du 11,12-EET sur les canaux K_{Ca} . La figure 3.9 présente l'évaluation de l'effet de la molécule sur les constantes de temps d'un canal unitaire, où la P_o en contrôle était de 0.08, et la P_o après l'addition du 11,12-EET ($1.5 \mu\text{M}$) était de 0.4. Les histogrammes des temps d'ouverture ont été ajustés avec une seule exponentielle, présentant donc une seule constante de temps d'ouverture, alors que les temps de fermeture sont mieux décrits par deux exponentielles. La constante de temps d'ouverture est passée de 13.0 ms à 20.5 ms, une augmentation qui est considérable, de l'ordre de 50%. La constante des temps de fermeture courts (τ_n) est passée de 1.17 ms à 11.7 ms, une augmentation d'environ 10 ms. Par contre, le changement le plus significatif a été observé sur les temps de fermeture longs. Alors que la constante de temps (τ_l) était à 231 ms en contrôle, elle a chuté à seulement 46.1 ms avec la présence du 11,12-EET. Ces changements des temps d'ouverture et de fermeture expliquent l'augmentation de la P_o des canaux par le 11,12-EET.

Figure 3.9. Représentation de l'effet du 11,12-EET sur les constantes de temps d'ouverture (τ_o) et de fermeture (τ_f) des canaux K_{Ca} . A : constantes de temps en contrôle. Les temps d'ouvertures présentent une seule constante de temps, alors que les temps de fermeture présentent deux constantes de temps. B : effet de 1.5 μ M 11,12-EET *cis* sur les constantes de temps. Les valeurs des constantes de temps ont été déterminées par l'ajustement des histogrammes avec une ou deux exponentielles, selon le cas.

A contrôle + 20 mV, 250 / 250 KCl *trans* / *cis*, 0.6 μM (Ca^{2+})_{trans}

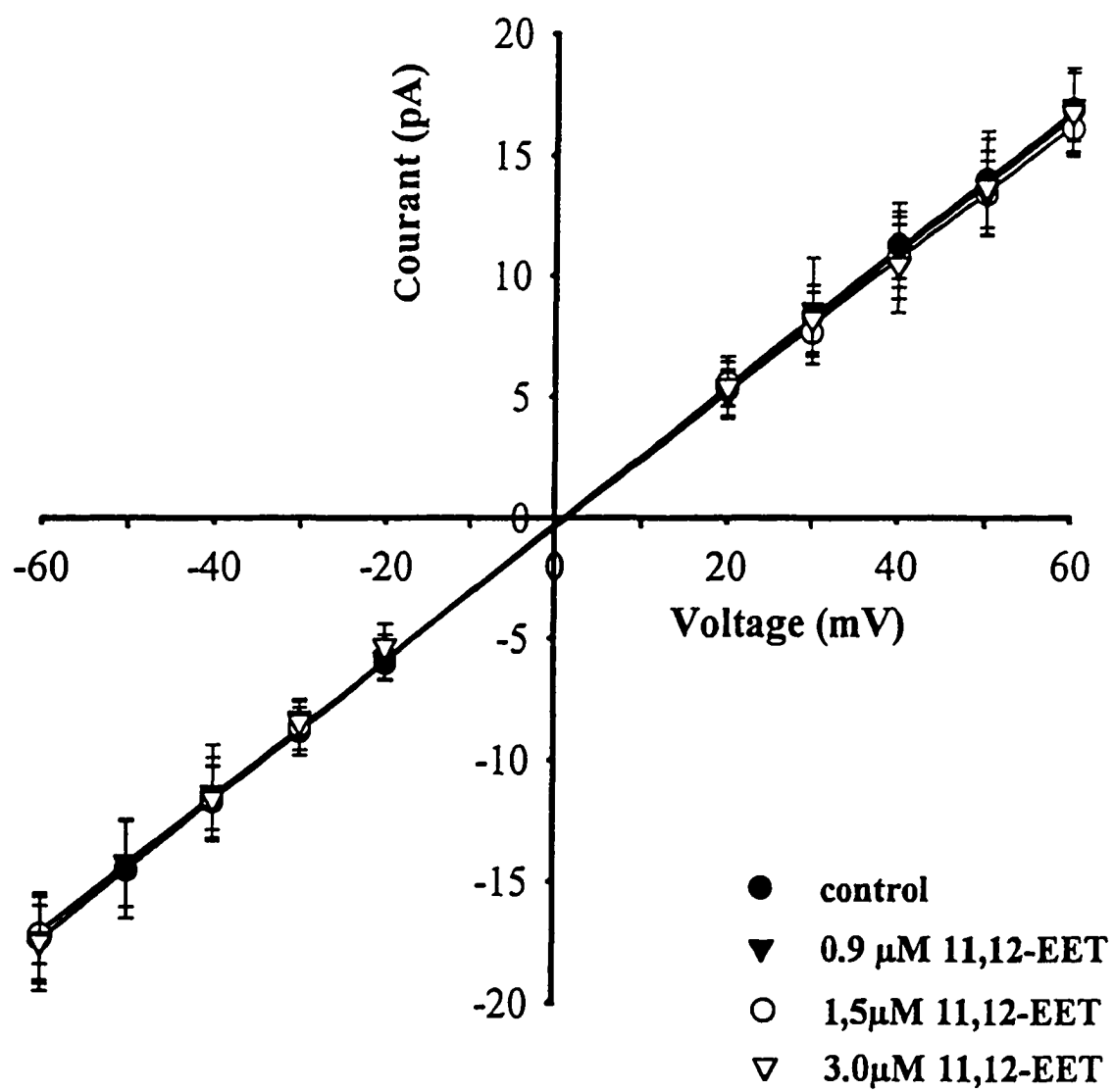


B +1.5 μM 11,12-EET *cis*



temps ($\text{s} \times 10^{-1}$)

Figure 3.10. Effet du 11,12-EET *cis* sur la conductance des canaux K_{Ca} . Le graphique présente la l'amplitude de courant unitaire produit par les canaux, en fonction du voltage. La pente des courbes linéaires obtenues représente la conductance des canaux dans les conditions déterminées (n=3 à 6).



Malgré son effet sur la Po des canaux, le 11,12-EET n'a aucun effet sur la conductance des canaux K_{Ca} (Fig. 3.10). Aux trois concentrations présentées précédemment (0.9, 1.5 et 3.0 μM), où il y avait une augmentation de la Po des canaux, la conductance est restée la même, en moyenne, par rapport aux contrôles.

3.1.4 Expériences de contrôle avec l'éthanol, l'AA et le PAF

Comme présenté à la figure 3.8, le 11,12-EET agit sur les canaux K_{Ca} du côté extracellulaire. La figure 3.11 montre, premièrement, les effets du 11,12-EET présentés précédemment, et les effets du solvant (l'éthanol), ainsi que les effets du 11,12-EET ajouté du côté *trans* (intracellulaire). Comme indiqué sur l'histogramme, le solvant n'affecte pas l'activité des canaux, confirmant ainsi l'effet de la molécule 11,12-EET elle-même. Le 11,12-EET ajouté du côté *trans* est aussi sans effet sur l'activité des canaux. Ceci précise donc que le 11,12-EET agit du côté extracellulaire seulement. En plus de ces expériences de contrôle, deux autres molécules lipidiques ont été étudiées, soit l'acide arachidonique (AA), et les platelet-activating factors (PAF). L'AA, étant le précurseur du 11,12-EET, a une structure semblable mais ne possède pas de groupement époxy. L'AA active aussi les canaux K_{Ca} en milieu extracellulaire, mais est moins effectif que le 11,12-EET. À 3.0 μM , l'AA n'a pas d'effet significatif, alors que le 11,12-EET, à cette concentration, active les canaux par un facteur 4. Le PAF, par contre, n'a aucun effet sur l'activité des canaux, même à une concentration de 10 μM .

Figure 3.11. Graphique représentant les effets du 11,12-EET du côté *cis* et *trans* du canal, de l'éthanol, de l'acide arachidonique (AA), et du platelet-activating factor (PAF) sur l'activité des canaux K_{Ca} . Le premier groupe de résultats représente le contrôle. Le deuxième groupe de résultats représente les effets du 11,12-EET *cis*, de son solvant (éthanol) *cis* (n=3), et du 11,12-EET *trans* (n=3). Le troisième groupe de résultats présente l'effet de l'addition de l'AA *cis*, à différentes concentrations (n=4). Le dernier groupe représente l'effet de l'addition du PAF à différentes concentrations *cis* (n=4). La valeur du contrôle est à 1, et les différentes valeurs sont présentées par la NPo des canaux dans la condition déterminée, divisées par la NPo en contrôle. * signifie que la valeur est significativement plus grande que le contrôle.

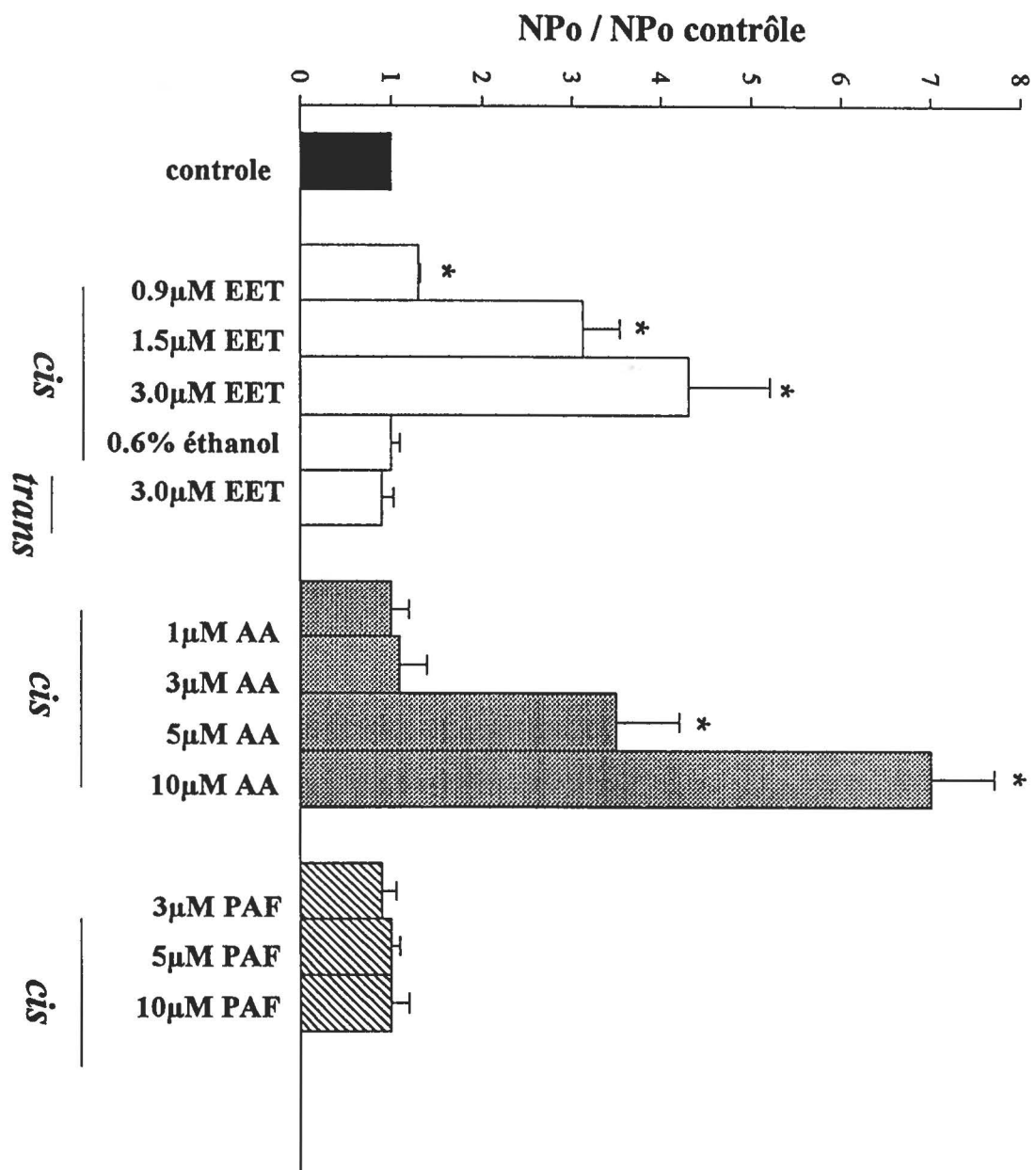
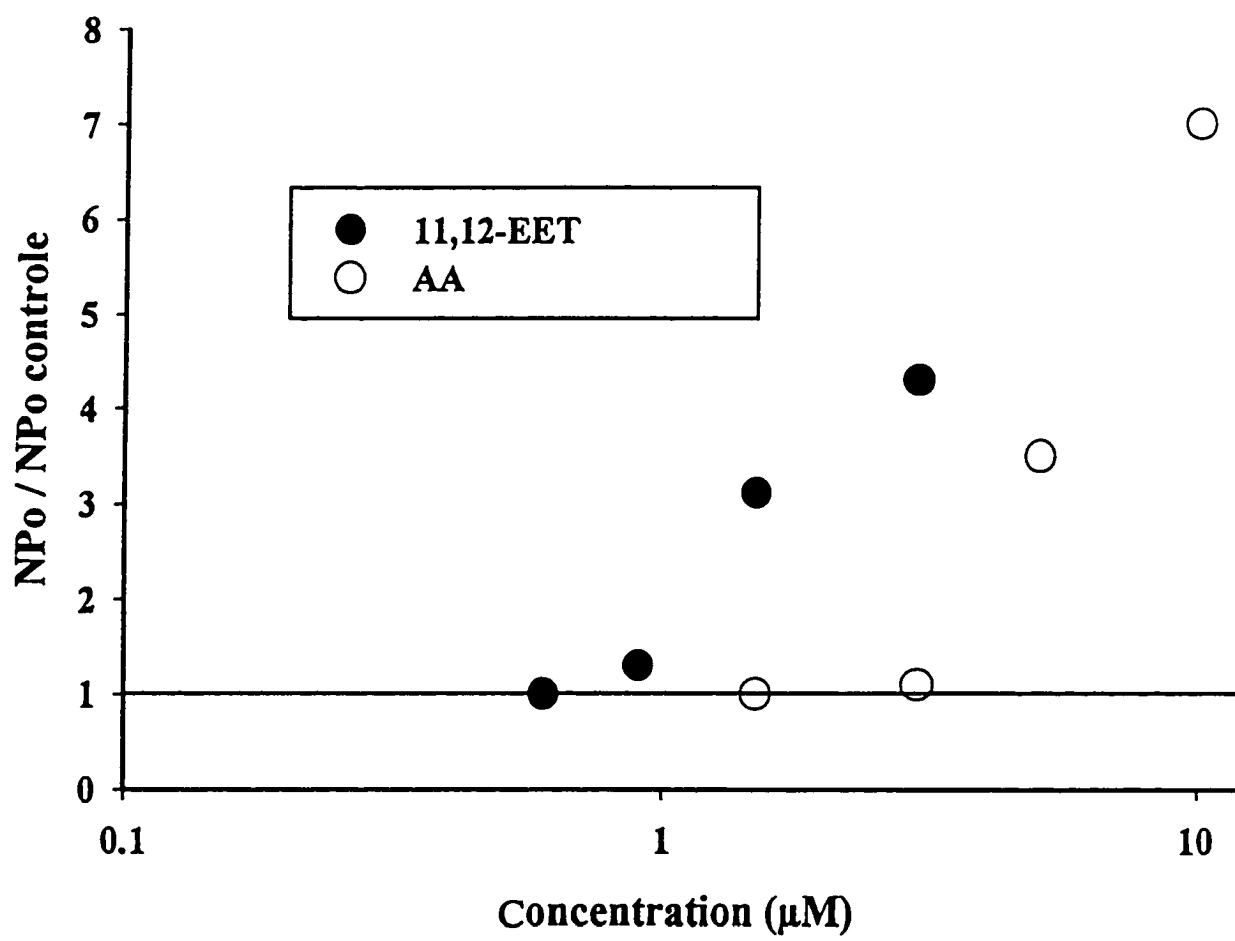


Figure 3.12. Représentation de l'activation des canaux K_{Ca} par le 11,12-EET et l'AA. Quatre concentrations pour les deux molécules sont évaluées dans ce graphique. La valeur de 1 est la valeur du contrôle, c'est-à-dire, lorsque les canaux ne sont pas en présence de 11,12-EET ou de AA, et les différents points représentent la valeur moyenne obtenue pour 3 à 6 expériences.



La différence des effets du 11,12-EET et de l'AA est présentée sur le graphique de la figure 3.12. La structure des deux molécules ne diffère que par le groupement époxy sur la molécule EET. Les résultats suggèrent donc un effet spécifique du groupement époxy sur la Po des canaux K_{Ca} . Les concentrations maximales des deux molécules n'ont pas été atteintes à cause de la concentration toujours croissante et néfaste de l'éthanol sur la membrane artificielle.

3.1.5 Étude de l'implication d'une protéine G dans les effets du 11,12-EET

Finalement, le mécanisme d'action du 11,12-EET sur les canaux K_{Ca} a été étudié. L'hypothèse émise, d'après des résultats antérieurs (voir Fig. 3.8), proposait que la molécule devait agir directement sur le canal, soit en se liant sur les protéines du canal, ou sur les phospholipides de la membrane artificielle. Par contre, on supposait qu'une protéine G n'était pas impliquée dans cette activation. L'activation éventuelle des canaux K_{Ca} par une protéine G, dans les expériences de reconstitution membranaire, a donc été évaluée. La figure 3.13 démontre que ni le GTP, ni le GTPyS, du côté *trans*, n'ont affecté la Po des canaux. De plus, l'activation par le 11,12-EET n'a pas été augmentée par la présence de GTP, éliminant ainsi la contribution d'une protéine G.

3.2. Mesures de tensions musculaires isométriques

Comme le 11,12-EET active la conductance K^+ médiée par les canaux K_{Ca} , il favorise donc, au niveau cellulaire, un courant sortant qui provoque la repolarisation des cellules musculaires dépolarisées ou l'hyperpolarisation de cellules musculaires au repos.

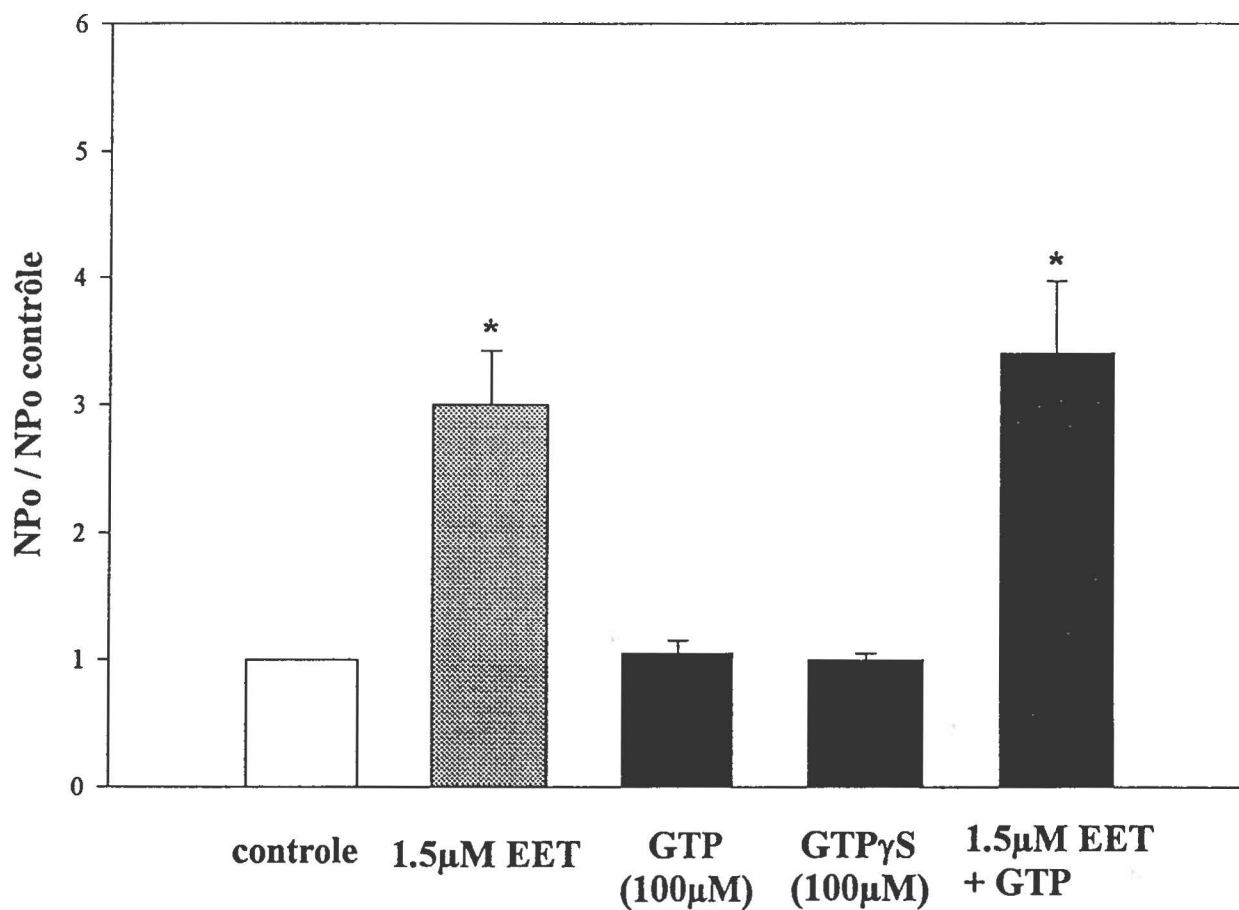


Figure 3.13. Graphique qui présente les effets du GTP et du GTP γ S, et du 11,12-EET en présence de GTP ou sans GTP. Le GTP et le GTP γ S ont été ajoutés du côté *trans* (intracellulaire), alors que le 11,12-EET a été ajouté du côté *cis* (extracellulaire). Les résultats sont la moyenne \pm écart-type de n = 3 - 6 expériences.

Au niveau du muscle lisse, la repolarisation des cellules favorise la relaxation d'un muscle contracté. Des études de mesures de tensions musculaires ont donc été effectuées sur des bronches de cobayes. La figure 3.14 présente les résultats obtenus des effets de l'addition du 11,12-EET exogène sur les bronches contractées avec le CCh (0.2 μ M). Les résultats montrent que la molécule n'a aucun effet sur des bronches lorsque l'épithélium était encore présent. Par contre, les bronches dont on avait enlevé l'épithélium ont été relaxées par la présence de 2 μ M 11,12-EET. Il faut aussi tenir compte de la relaxation produite par l'éthanol, et c'est donc pourquoi les résultats présentent les pourcentages de relaxation produits par le 11,12-EET, et produits par le solvant seul. Par la soustraction du pourcentage de relaxation induit par l'éthanol, on obtient une valeur de 5.8% de relaxation totale produite par le 11,12-EET en moyenne.

Le tableau 3.1 présente la comparaison des résultats présentés à la figure 3.14 avec les effets produits par le 11,12-EET dilué dans un autre solvant, toujours sur des bronches dénudées. Le 11,12-EET a été dilué dans le DMSO, et ses effets ont été étudiés. Le DMSO présente aussi, comme l'éthanol, des effets bronchorelaxants, et le 11,12-EET, dilué dans ce solvant, est aussi effectif. Si on soustrait les effets du DMSO, le 11,12-EET a produit des relaxations de 3.3 à 4% en moyenne à des concentrations de 1.5 et 3.0 μ M, respectivement.

Figure 3.14. Effet du 11,12-EET exogène sur la relaxation des muscles lisses bronchiques de cobayes. **A** : trace représentative obtenue dans une expérience de mesure de tension musculaire isométrique sur une bronche dont l'épithélium a été préalablement enlevée de façon mécanique. La bronche a été contractée avec 0.2 μ M carbamylcholine (CCh), et 2 μ M 11,12-EET ou 0.6 % éthanol (EtOH) ont été ajoutés au bain d'organe. **W** représente les lavages effectués. **B** : pourcentage de relaxation moyen de plusieurs bronches précontractées, avec ou sans l'épithélium, suite à l'addition du 11,12-EET exogène ou de son solvant, l'éthanol. * signifie une valeur significativement plus grande que la valeur obtenue avec le solvant seul.

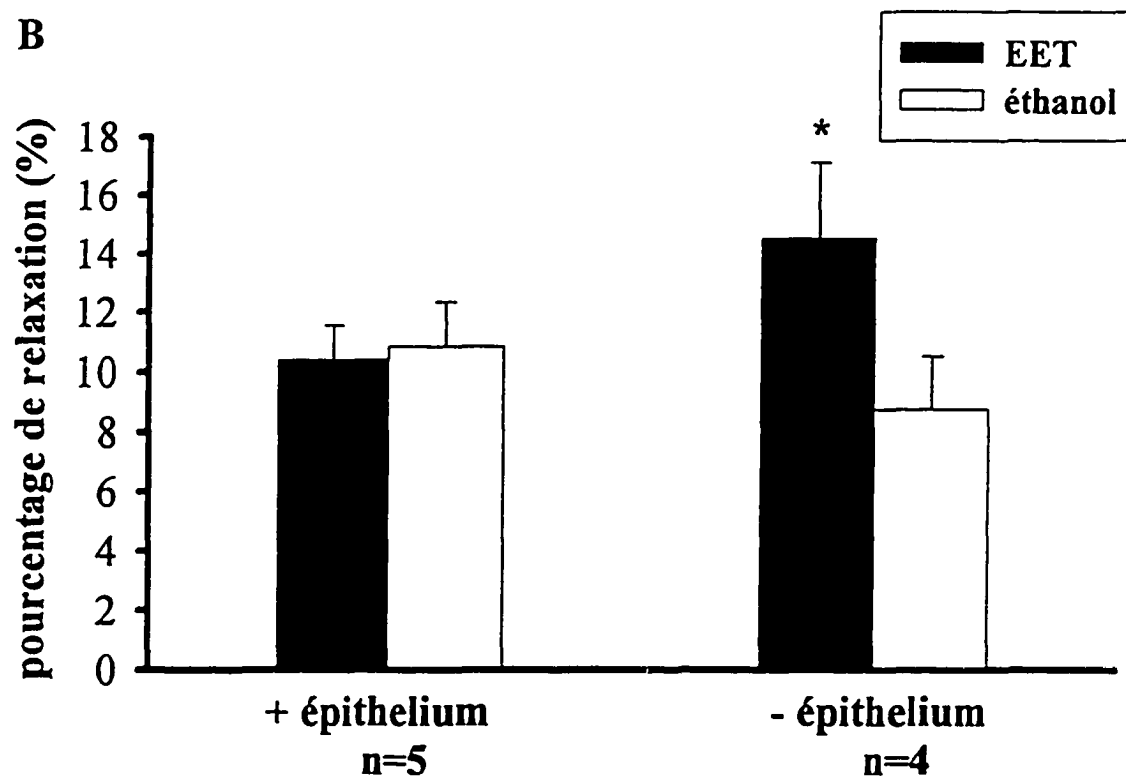
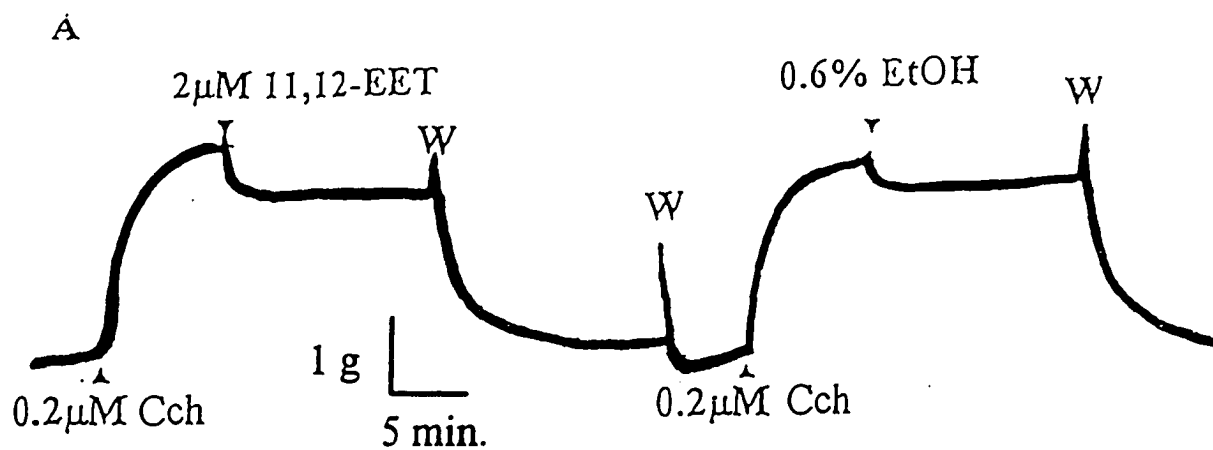


Tableau 3.1
Relaxation des muscles lisses de bronches de cobayes par le 11,12-EET

	concentration	pourcentage relaxation (%)
11,12-EET / EtOH	2.0 μ M	14.5 \pm 3.5 *
EtOH	0.6 %	8.7 \pm 1.5
11,12-EET / DMSO	1.5 μ M	13.3 \pm 1.1 *
	3.0 μ M	23.0 \pm 2.5 *
DMSO	0.5 %	10 \pm 0.1
	1.0 %	19 \pm 1.3

Pourcentage de relaxation des muscles lisses de bronches de cobayes par le 11,12-EET à différentes concentrations et dilué dans deux solvants différent, l'éthanol (EtOH) et le diméthylsulfoxyde (DMSO). Les résultats sont la moyenne \pm écart-type de n = 4 - 5 expériences.

* signifie que la relaxation par le 11,12-EET est significativement plus grande que la relaxation par le solvant seul.

4. DISCUSSION

4.1 identification et caractérisation des canaux K_{Ca}

Les canaux potassiques de type K_{Ca} ont été identifiés et caractérisés par la méthode de reconstitution membranaire. Ces canaux sont présents en quantité très élevée au niveau des muscles lisses des voies respiratoires (McCann et Welsh, 1986). Lors de la fusion d'une microvésicule, formée à partir de la membrane de surface d'une cellule de MLVR, il y a généralement la présence de canaux K_{Ca} .

Un autre type de canal, perméable aux ions Cl^- , est souvent présent lors d'une fusion et accompagne les canaux K_{Ca} (Fig. 3.1). Ces canaux Cl^- sont insensibles au Ca^{2+} , contrairement aux canaux K_{Ca} . Ils ont été caractérisés antérieurement dans notre laboratoire mais rien n'est encore vraiment connu sur les propriétés et les fonctions de ce type de canal Cl^- (Salvail *et al.*, 1996).

Les propriétés biophysiques et pharmacologiques des canaux K_{Ca} ainsi que leurs fonctions sont bien connues dans plusieurs tissus, notamment au niveau des MLVR (Kaczorowski *et al.*, 1996). Pour caractériser les canaux K_{Ca} , les conductances à différents gradients de concentration de KCl ont été calculées, la sélectivité au ions K^+ a été déterminée, et la dépendance au voltage, ainsi que la sensibilité au Ca^{2+} libre cytoplasmique

ont été mesurées. Un bloqueur non-spécifique des canaux K_{Ca} et un bloqueur très spécifique de ces canaux ont aussi été utilisés pour leur caractérisation. Lors des mesures de courants unitaires en condition asymétrique, 50 / 250 KCl *trans* / *cis*, la conductance des canaux était en moyenne de 227 pS, alors qu'en condition symétrique, 250 / 250 KCl *trans* / *cis*, la conductance était de 283 pS (Fig. 3.2). Ces conductances sont comparables avec ce qui est décrit dans la littérature, au niveau des canaux K_{Ca} des MLVR (Savaria *et al.*, 1992 ; Kotlikoff, 1993 ; Tomita *et al.*, 1994). La différence de conductance à différents gradients de concentration peut s'expliquer par le fait qu'à plus faibles concentrations, beaucoup moins d'ions K^+ sont présents à l'entrée du pore du canal, où certains sites de liaison sont présents et sont saturables (Blatz et Magleby, 1984 ; Cecchi *et al.*, 1986). Alors, à de faibles concentrations, lors du passage du canal à l'état ouvert, moins d'ions sont disponibles pour le passage à travers la membrane, et donc, les sites ne sont pas saturés, et c'est ce qui peut expliquer un plus faible courant unitaire produit et ainsi une plus faible conductance. Le potentiel de zéro courant du K^+ était de -40 mV en condition asymétrique, et 0 mV en condition symétrique. Ces valeurs sont comparables aux valeurs théoriques des E_K calculées avec l'équation de Nernst:

$$E_K = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[K^+]_{\text{extracell.}}}{[K^+]_{\text{intrac.}}}$$

où R est la constante des gaz parfaits, T est la température absolue, Z est la valence de l'ion, et F est la constante de Faraday. À 20 °C, $RT/F = 25.26$ mV ; la valence de l'ion K^+ est +1. Alors, pour des concentrations de 250 mM K^+ extracellulaire et 50 mM K^+ intracellulaire, E_K est -41 mV. En condition symétrique, la valeur du potentiel d'inversion

est de 0 mV. Des résultats expérimentaux comparables aux valeurs calculées indiquent donc que les canaux K_{Ca} sont très sélectifs aux ions K^+ par rapport aux ions Cl^- présents dans la solution, comme l'on mentionné plusieurs auteurs (Savaria *et al.*, 1992 ; Garcia-Calvo *et al.*, 1994 ; Giangiacomo *et al.*, 1995). Au potentiel d'inversion, le courant unitaire est nul, puisque le flux net d'ions K^+ est nul. Ce phénomène est décrit par l'équation dérivée de la loi d'Ohm :

$$i_K = \gamma_K (V_m - E_K)$$

où i_K est le courant unitaire des ions K^+ , γ_K est la conductance unitaire du canal, V_m est le potentiel de membrane, et E_K est le potentiel d'inversion des ions K^+ . Donc, d'après cette équation, si $V_m = E_K$, c'est-à-dire si le potentiel de membrane est au potentiel d'inversion des ions K^+ , alors $V_m - E_K$, qui représente de gradient électrochimique, sera égal à 0 et l'équation donnera un courant (i_K) égal à 0 pA.

Donc, le courant produit par un canal varie en fonction du voltage appliqué, et ceci est dû au gradient électrochimique. Par contre, la probabilité d'ouverture (P_o) du canal est indépendante du gradient électrochimique. La P_o du canal K_{Ca} est cependant dépendante du voltage appliqué, une propriété due au segment transmembranaire S4 de la sous-unité α du canal (Butler *et al.*, 1993 ; Garcia-Calvo *et al.*, 1994 ; Knaus *et al.*, 1994). Le canal est très actif à des potentiels positifs, mais sa P_o diminue graduellement lorsque le voltage passe à des valeurs négatives (Fig. 3.3). Ce travail présente des valeurs $V_{1/2}$ estimées à -42 mV en présence de 10 μM Ca^{2+} cytoplasmique, et +26 mV en présence de 2 μM Ca^{2+}

cytoplasmique, des valeurs qui sont différentes de celles présentées dans certains travaux (Savaria *et al.*, 1992 ; Garcia-Calvo *et al.*, 1994), mais en accord avec d'autres travaux (voir références dans Carl *et al.*, 1996). La dépendance au voltage de la Po des canaux K_{Ca} est très variable d'un tissu à l'autre, et peut dépendre des conditions expérimentales. Il est connu que la composition lipidique de la membrane où est présent un canal K_{Ca} peut changer sa cinétique (Moczydlowski *et al.*, 1985 ; McManus, 1991). Des travaux effectués dans notre laboratoire (Savaria *et al.*, 1992), et dont une des figures est présentée dans ce travail (Fig. 3.4), montrent que la dépendance du canal au voltage est très différente des résultats présentés ici. Ceci s'explique, malgré l'utilisation de la même technique, par la différence de composition des lipides qui composent la membrane artificielle. Dans les travaux de Savaria *et al.* (1992), les membranes étaient composées de 30 % de DOTAP, un lipide chargé positivement, alors que pour la présente étude (voir **MATÉRIEL ET MÉTHODES**) les membranes étaient composées de 30 % phosphatidylsérine (PS), un phospholipide chargé négativement. Dans tous les cas, par contre, la Po exprimée en fonction du voltage est décrite par une équation de Boltzmann (voir Fig. 3.3). La différence de sensibilité au voltage appliqué peut être une différence de sensibilité aux ions Ca^{2+} cytoplasmiques. Il est connu que les $[Ca^{2+}]$ dans les expériences de BLP doivent être 10 fois plus grande pour avoir des Po semblables à celles mesurées lors des expériences avec la technique de patch-clamp, aux mêmes voltages (Kapicka *et al.*, 1994). La différence de l'activité des canaux K_{Ca} dans ces deux techniques ne réside pas dans la technique de mesure des courants ; l'activité des canaux est très dépendante de la composition lipidique des membranes où sont présents les canaux (Moczydlowski *et al.*, 1985).

Les mesures de sensibilité au Ca^{2+} libre cytoplasmique (Fig. 3.5) ont montré que les résultats sont décrits par l'équation de Hill, où le coefficient de Hill (n) avait une valeur de 2.81 et le K_d était de $0.85 \mu\text{M Ca}^{2+}$. Ces valeurs sont comparables à certains travaux antérieurs (Vergara et Latorre, 1983 ; DiChiara et Reinhart, 1995), et différentes des valeurs présentées dans d'autres travaux (Savaria *et al.*, 1992 ; Carl *et al.*, 1996). La sensibilité au Ca^{2+} , possiblement due aux segments transmembranaires S9 et S10 des sous-unités α des canaux KCa , du côté cytoplasmique (Wei *et al.*, 1994), peut dépendre de plusieurs facteurs (Carl *et al.*, 1996), dont la composition lipidique de la membrane (McManus, 1991). La différence de sensibilité au Ca^{2+} est très variable, non seulement d'un tissu à l'autre, mais aussi au niveau d'un même tissu (DiChiara et Reinhart, 1995 ; Carl *et al.*, 1996 ; Chang *et al.*, 1997).

En plus de cette caractérisation biophysique des canaux KCa , une caractérisation pharmacologique a été effectuée à l'aide du TEA et de l'IbTX. Le TEA ($100\mu\text{M}$) a produit une diminution de la conductance des canaux, de 260 pS à 110 pS, soit une baisse de plus de la moitié de la conductance (Fig. 3.6). Le TEA est un bloqueur qui se place dans le pore du canal et obstrue le passage des ions K^+ . L'IbTX a eu pour effet de réduire considérablement le courant K^+ unitaire (Fig 3.7). L'IbTX est un bloqueur peptidique de 37 acides aminés et est le plus spécifique des bloqueurs des canaux KCa connu à ce jour (Giangiacomo *et al.*, 1992). Il se lie à la face externe du canal KCa et bloque ainsi le flux de K^+ . L'IbTX est plus spécifique que la ChTX, dont la séquence d'acides aminés montre une identité de 68% dans sa séquence (Miller *et al.*, 1985 ; Gimenez *et al.*, 1988).

4.2 effets du 11,12-EET et d'autres lipides sur les canaux K_{Ca}

Les résultats montrent une activation des canaux K_{Ca} par le 11,12-EET exogène ajouté en milieu extracellulaire (Fig. 3.8). Une concentration de 0.9 μM 11,12-EET, la plus faible concentration à avoir un effet significatif, multiplie la NPo des canaux K_{Ca} par 1.2. L'activation est dépendante de la concentration du 11,12-EET ; l'augmentation de la concentration à 1.5 μM triple la NPo des canaux et 3.0 μM 11,12-EET augmente la NPo d'un facteur 4. Les concentrations produisant une activation maximale n'ont pas été atteintes puisqu'il fallait tenir compte de la concentration d'éthanol dans le bain expérimental. Une concentration trop élevée est néfaste à la membrane lipidique. Le 11,12-EET étant déjà en solution à une faible concentration (300 μM) à l'achat, il est difficile d'utiliser une solution-mère plus concentrée ; il faut tenir compte que la molécule est très sensible à la lumière et à l'oxygène et des manipulations pour concentrer la solution pourraient ne pas être très appropriées. Cette activation est beaucoup plus faible que ce qui a été évalué sur les canaux K_{Ca} des muscles lisses des artères cérébrales de chats, où 5 μM 11,12-EET augmente la NPo des canaux d'un facteur 60 (Gebremedhin, *et al.*, 1992). Par contre, pour tous les isomères EET, la Po des canaux K_{Ca} était doublée par l'application de 0.3 - 1 μM au niveau des muscles lisses de l'aorte du cobaye, 0.1 μM au niveau des muscles lisses des artères coronaires de porc, et 1.0 - 3.0 μM pour les muscles lisses des artères caudales de rat (Hu et Kim, 1993). Au niveau des artères coronaires de bœuf, 1.0 μM 11,12-EET augmente la NPo des canaux K_{Ca} de 10-15 fois par rapport aux témoins (Li *et al.*, 1997 ; Li et Campbell, 1997). Tous ces résultats ont été obtenus sur

des cellules isolées en utilisant la méthode de patch-clamp en configuration cell-attached, et les expériences en configuration excisée ont montré que les différents isomères EET n'avaient aucun effet sur la Po des canaux K_{Ca} . Cependant, dans certaines des expériences de patch-clamp en configuration excisée, l'addition de GTP dans le milieu cytoplasmique a induit l'activation des canaux K_{Ca} des muscles lisses des artères coronaires de bœuf par le 11,12-EET (Li et Campbell, 1997). Ces résultats indiquent l'implication d'une protéine G, activée par le 11,12-EET par un mécanisme encore inconnu. La protéine G serait de type G_s , puisqu'un inhibiteur anti- G_{sa} a inhibé l'activation des canaux K_{Ca} par le 11,12-EET. La sous-unité α de la protéine G, régule les canaux K_{Ca} par deux mécanismes indépendants (Kume *et al.* 1994). G_{sa} peut activer l'adénylate cyclase et produire l'AMPC, résultant en une phosphorylation PKA-dépendante des canaux K_{Ca} . Alternativement, G_{sa} peut avoir une action directe sur le canal. Dans les expériences impliquant le 11,12-EET et la protéines G, (Li et Campbell, 1997), il apparaît que l'activation des canaux K_{Ca} se ferait par la voie directe. Malgré que les plus récents travaux indiquent l'implication d'une protéine G, et non un effet direct du 11,12-EET sur les canaux, les résultats de ce présent travail tendent à écarter cette hypothèse. Évidemment, il est probable que des protéines G soient présentes lors de la reconstitution membranaire dans nos expériences, cependant, l'absence de GTP dans les solutions utilisées élimine presque totalement la possibilité de l'implication de ces protéines. Malgré qu'une infime quantité de GTP puisse être présente au niveau du milieu interne des microvésicules qui ont fusionnées, l'activation n'aurait sûrement pas été aussi importante, et aurait été transitoire si les activations étaient produites par une protéine G. Dans nos expériences, on observe que les activations ne changent pas en fonction du temps (plus de 30 minutes). On pourrait toutefois penser à une double

activation des canaux K_{Ca} des MLVR par le 11,12-EET au niveau des cellules: activation directe et activation par l'intermédiaire d'une protéine G. La deuxième voie n'étant pas présente dans nos expériences de reconstitution membranaire, ceci pourrait être une explication de la différence des effets du 11,12-EET comparativement aux travaux de Li et Campbell (1997). Même si on peut éliminer l'implication d'une protéine G, on ne peut pas savoir si les molécules 11,12-EET se lient spécifiquement sur une protéine du canal, ou si les molécules se lient aux phospholipides de la membrane. Si la liaison aux phospholipides est la voie qui mène à l'activation des canaux K_{Ca} , il peut être important de considérer la différence de composition lipidique des membranes artificielles et des membranes cellulaires. Cette voie est très plausible puisqu'il est bien connu dans la littérature que les isomères EET se lient au phospholipides des membranes cellulaires (Bernstrom *et al.*, 1992). Ceci pourrait être une autre explication pour la différence des effets du 11,12-EET sur la P_o des canaux K_{Ca} entre les différents travaux. Les effets des EETs sur les constantes de temps d'ouvertures et de fermetures des canaux K_{Ca} n'ont pas été rapportés dans la littérature. Les résultats présentés dans ce travail sont la mesure des constantes de temps d'un canal qui a une P_o témoin de 0.08, et de 0.4 après addition de 1.5 μ M 11,12-EET extracellulaire. L'effet le plus marquant se fait sur la constante des temps de fermeture longs. La constante a une valeur de 231 ms (expérience témoin), et est réduite à 46.1 ms suite à l'action du 11,12-EET. Malgré l'activation de la P_o des canaux K_{Ca} , le 11,12-EET n'a aucun effet sur leurs conductances (Fig 3.10). Sur ce point, tous les travaux sont en accord, autant pour le 11,12-EET que pour tous les autres isomères (Gebremedhin *et al.*, 1992 ; Hu et Kim, 1993 ; Campbell *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 1997 ; Li et Campbell, 1997).

Le 11,12-EET active les canaux K_{Ca} du côté *cis*, mais n'a aucun effet du côté *trans* dans nos expériences (Fig. 3.11). Selon les travaux antérieurs (Gebremedhin *et al.*, 1992 ; Hu et Kim, 1993 ; Campbell *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 1997), les EETs activent les canaux K_{Ca} du côté extracellulaire. Cependant, ces travaux présentent des résultats obtenus par l'utilisation de la méthode de patch-clamp en configuration cell-attached. En configuration excisée, les EETs n'ont aucun effet en milieu cytoplasmique, selon Hu et Kim (1993). Li et Campbell (1997) ont montré au niveau des artères coronaires de bœuf, en configuration excisée, que le 11,12-EET n'avait aucun effet, ni du côté cytoplasmique, ni du côté extracellulaire. Cependant, comme mentionné plus haut, l'addition de GTP dans le milieu cytoplasmique permettait l'activation des canaux K_{Ca} par le 11,12-EET ajouté en milieu cytoplasmique. Toutefois, les auteurs ne peuvent pas démontrer que la molécule agit en milieu intracellulaire, ou si elle passe la membrane de surface et va activer un récepteur du côté extracellulaire. Des récepteurs pour le 14,15-EET ont été mis en évidence dans les membranes de surface des cellules mononucléaires de cobayes (Wong *et al.*, 1993), démontrant la possibilité de tels récepteurs. Li et Campbell ont aussi conclu que les effets des EETs en configuration cell-attached, qu'il ont évalués, et qui ont été évalués par d'autres auteurs (Gebremedhin *et al.*, 1992 ; Hu et Kim, 1993 ; Campbell *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 1997), n'étaient dus qu'à l'activation d'une protéine G par les EETs. Pour l'instant, ce qui semble être accepté dans la littérature au niveau des muscles lisses artériels, est que les isomères EET sont relâchés par les cellules endothéliales, et que leur action sur les canaux K_{Ca} se fait par l'entrée des molécules dans le cytoplasme des cellules musculaires (Quilley *et al.*, 1997).

Selon certains auteurs, le groupement époxy sur les molécules EETs est essentiel pour produire leur effet activateur sur les canaux K_{Ca} . Certains auteurs ont utilisé l'acide arachidonique, le précurseur des EETs, comme témoin (Campbell *et al.*, 1996), alors que d'autres ont utilisé le 20-HETE, un autre métabolite de l'acide arachidonique produit par le CYT P450 (Li et Campbell, 1997). L'acide arachidonique n'avait aucun effet sur les canaux K_{Ca} , même à des concentrations de 10 μ M, et avec tous les éléments présumés nécessaires à l'activation des canaux par les EETs, puisque les expériences ont été effectuées en configuration cell-attached. Le 20-HETE, par contre, causait une inhibition des canaux K_{Ca} en diminuant la NPo au tiers de la NPo en contrôle, et ce, à des concentrations de seulement 100 nM. Nous avons évalué les effets de l'acide arachidonique extracellulaire et du platelet-activating factor (PAF), sur l'activité des canaux K_{Ca} (Fig. 3.11). Nous avons observé des activations très importantes induite par l'acide arachidonique à différentes concentrations, et bien sûr, ces activations se sont produites sans la présence d'éléments intracellulaires, donc en limitant l'implication d'une protéine G. Cependant, le PAF, un lipide dérivé du phosphatidylcholine, n'avait aucun effet, même à des concentrations aussi élevées que 10 μ M. Donc, on doit considérer que le groupement époxy sur la molécule 11,12-EET n'est pas essentiel à l'activation des canaux K_{Ca} . Cependant, comme le montre la figure 3.11, et plus directement la figure 3.12, le 11,12-EET activent les canaux à des concentrations beaucoup plus faibles que l'acide arachidonique. À 3.0 μ M, l'acide arachidonique n'a pas d'effet significatif sur la NPo des canaux, alors que le 11,12-EET active les canaux d'un facteur 4. Ces résultats sont donc en désaccord avec les travaux effectués sur les canaux K_{Ca} des MLV présentant

aucun effet de l'AA. Les résultats confirment que le groupement époxy du 11,12-EET n'est pas nécessaire à l'activation des canaux, mais est important pour le pouvoir activateur de la molécule. On ne peut être certain si l'acide arachidonique agit par le même mécanisme que le 11,12-EET dans nos expériences. On pourrait penser à un site de liaison spécifique pour les eicosanoïdes sur une protéine du canal K_{Ca} , ou sur un phospholipide. Mais on pourrait aussi penser à une partition non-spécifique dans la membrane. Il est donc important de mentionner que la différence des résultats entre ceux présentés dans ce travail et ceux présentés dans la littérature peut être une différence dans les protéines des canaux K_{Ca} de différents tissus, ou une différence dans la composition lipidique des membranes où se situe les canaux. L'évaluation de l'effet des autres eicosanoïdes, tels les leucotriènes (LTs) et les prostaglandines (PGs), serait intéressante. Nous avons évalué le LTD₄ à des concentrations physiologiquement actives (10-100 nM). Le LTD₄ était sans effet sur la Po des canaux (résultats non-illustrés). Cependant, ces concentrations étaient beaucoup trop faibles pour servir de contrôles fiables.

Il a été proposé dans ce travail qu'il pouvait y avoir une double activation des canaux K_{Ca} des MLVR par le 11,12-EET, soit une activation directe comme décrit dans ce travail, et une activation impliquant une protéine G, tel que proposé par Li et Campbell (1997). Au niveau d'une cellule *in vivo*, le canal subit peut-être cette double activation. Donc, pour vérifier cette hypothèse, l'existence de protéines G dans les BLP et leur activation par le 11,12-EET ont été étudiées (Fig. 3.13). L'addition de 100µM GTP ou de GTPγS du côté *trans* n'a produit aucun effet sur la Po des canaux. Si une protéine G, avait été présente, il y aurait eu une légère activation des canaux K_{Ca} par le GTPγS, comme

rapporté par d'autres auteurs (Kume *et al.*, 1992). Donc, si certains types de protéine G sont présents dans les BLP, il semble que ces protéines ne soient pas responsables de l'activation des canaux K_{Ca} . L'addition du 11,12-EET extracellulaire (1.5 μ M), en présence de 100 μ M GTP, n'a produit qu'une activation de l'ordre de l'activation produite par le 11,12-EET seul. Donc, l'hypothèse de la double activation n'est pas prouvée. Cependant, la présence des protéines G, fonctionnelles, qui activent les canaux K_{Ca} lorsqu'elles sont stimulées, peut être peu fréquente lors des reconstitutions en BLP. Des expériences de patch-clamp, en présence de GTP, devraient être effectuées pour mieux simuler les conditions physiologiques des cellules.

4.3 effets du 11,12-EET sur les muscles lisses des voies respiratoires

Les mesures de tensions musculaires de bronches de cobayes ont été des expériences importantes afin de vérifier si le 11,12-EET avait bien un effet sur les muscles lisses des voies respiratoires. L'activation des canaux K_{Ca} par le 11,12-EET devrait, théoriquement, hyperpolariser les cellules musculaires, ou repolariser des cellules dépolarisées. Cet effet sur le potentiel de membrane des cellules musculaires peut causer la relaxation du muscle. Donc, les expériences de mesures de tension musculaire permettaient d'évaluer directement sur le tissu les effets du 11,12-EET. Des relaxations ont été produites par la molécules (Fig. 3.14 et Tableau 3.1). Évidemment, si on soustrait les effets des solvants (éthanol ou DMSO), on obtient une très faible relaxation, de l'ordre de 3 à 6 % à des concentrations de 1.5, 2.0, et 3.0 μ M 11,12-EET, sur des bronches dont l'épithélium avait été enlevé mécaniquement (le 11,12-EET n'a pas d'effet sur les bronches

qui possèdent leur épithélium). Ces résultats sont comparables aux travaux de Zeldin *et al.* (1995), où il est cité que des muscles lisses de bronches de cobayes, contractés à l'histamine, étaient relaxés de $7.3 \pm 3.8 \%$ par $10 \mu\text{M}$ 11,12-EET. Zeldin *et al.* (1995) n'ont cependant observé aucun effet de l'éthanol sur la tension des muscles lisses, contrairement aux résultats présentés à la figure 3.14 et dans le tableau 3.1, où l'éthanol causait une relaxation de 8.7% à une concentration de 0.6% , concentration équivalente à celle présente lors de l'addition de $2.0 \mu\text{M}$ 11,12-EET. Le changement de solvant, donc de l'éthanol au DMSO, avait pour seul but d'éliminer les effets de l'éthanol dans le but de mieux visualiser les effets du 11,12-EET. Le DMSO a aussi produit une relaxation, et même plus importante que l'éthanol. Les effets du 11,12-EET dans le DMSO étaient plus faibles qu'avec l'éthanol, dus certainement à une dégradation des molécules manipulées dans des conditions peu favorables (évaporation de l'éthanol et ajout du DMSO à l'air ambiant, où la lumière pouvait pénétrer dans le tube). Une solution envisagée pour résoudre le problème de solvant pourrait être l'utilisation des cyclodextrins, un transporteur de molécules hydrophobes (Thoburn Burns, 1994).

5. CONCLUSION

Cette étude est la première à rapporter les effets du 11,12-EET, et de tout autre isomère EET, sur les canaux potassiques de type K_{Ca} des MLVR. C'est aussi la première étude à démontrer une activation directe de ces canaux par les EETs. Elle a notamment permis de démontrer que le 11,12-EET pouvait activer directement les canaux K_{Ca} des MLVR reconstitués en bicouches lipidiques planes, et ce, sans l'implication d'une protéine G, comme présenté au niveau des canaux K_{Ca} des muscles lisses artériels. Le mécanisme par lequel le 11,12-EET active d'une façon directe les canaux n'a pas été élucidé. Deux voies possibles sont proposées: 1) l'interaction du 11,12-EET avec une protéine du canal K_{Ca} ; 2) la partition du 11,12-EET dans la membrane artificielle, ce qui démontre l'importance de la composition lipidique de la membrane pour les effets de la molécule. Le 11,12-EET n'affecte pas la conductance unitaire des canaux. Les effets du 11,12-EET sur la P_o des canaux K_{Ca} n'est mesurable que lorsque la molécule est ajoutée du côté extracellulaire (*cis*), et non du côté cytoplasmique (*trans*).

Le groupement époxy de la molécule 11,12-EET est spécifique à une augmentation de la P_o des canaux, mais le précurseur de cette molécule, l'acide arachidonique, peut aussi induire une activation des canaux K_{Ca} . Le PAF, un autre dérivé de l'acide arachidonique, ne produit cependant aucun effet sur la cinétique de ces canaux.

L'hypothèse de la double activation n'a pas été vérifiée puisque l'implication d'une protéine G, en plus de l'activation directe par le 11,12-EET, n'a pas été confirmée.

Le 11,12-EET produit une relaxation des muscles lisses de bronches de cobayes contractés avec la CCh. La relaxation est assez faible mais significative. On ne peut pas savoir, pour l'instant, si cette relaxation est produite par l'activation des canaux K_{Ca} seulement. D'autres travaux de notre laboratoire ont indiqué que le 11,12-EET pouvait aussi affecter un type de conductance Cl^- (Salvail *et al.*, 1997). Ces travaux rapportent une inhibition des canaux Cl^- insensibles au Ca^{2+} , et une hyperpolarisation des cellules musculaires des trachées de lapin d'environ 3 mV en présence de 11,12-EET. Cette hyperpolarisation pourrait donc s'expliquer par une augmentation de la conductance K^+ et une diminution de la conductance Cl^- , ce qui favoriserait l'inactivation du courant Ca^{2+} , et faciliter la relaxation des muscles.

Suite aux effets du 11,12-EET sur les canaux K_{Ca} , sur les canaux Cl^- , et aux effets d'hyperpolarisation des cellules musculaires et de relaxation des MLVR, il a été proposé que le 11,12-EET, et éventuellement les autres isomères (5,6-, 8,9-, 14,15-EET), représentent des EpDHF's au niveau des muscles lisses des trachées et des bronches (Dumoulin, *et.al.*, 1997). Des effets du 5,6-EET ont récemment été démontré dans le laboratoire (Salvail *et al.*, 1997). Les résultats montrent un effet beaucoup plus marqué de cet isomère sur la tension des MLVR comparativement aux effets du 11,12-EET.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Éric Rousseau pour m'avoir accepté dans son laboratoire, et surtout pour sa passion pour la science qui donne à ses étudiants le désir de comprendre.

Je désire aussi remercier les membres du jury : la Dre France Bessette, directrice du programme de Physiologie et Biophysique, le Dr Éric Rousseau, mon directeur de recherche et professeur agrégé au département de Physiologie / Biophysique, et le Dr Gilles Dupuis, professeur au département de Biochimie de la Faculté de Médecine de l'Université de Sherbrooke.

Je voudrais également remercier le Dr Alain Cadieux pour m'avoir donné la permission de travailler dans son laboratoire et pour la correction du manuscrit soumis à Am. J. Physiol. en novembre 1997. Il ne faut pas oublier son étudiante, Sophie B. Gaudreault, pour l'aide technique apportée dans le laboratoire.

Finalement, je tiens à souligner l'agréable climat de travail dans le laboratoire Le Bilarium, par la présence du très coloré Dany Salvail, ainsi que de notre très chère technicienne Sonia Proteau, et tous les autres étudiants qui ont été présents pendant mon séjour : Abder, Maryse, et Olivier.

BIBLIOGRAPHIE

Alioua, A., D. Salvail, J. Garon, M. Dumoulin, A. Cadieux, et E. Rousseau. (1997) Direct activation of GK_{Ca} channel in airway smooth muscle by nitric oxide : involvement of nitrosylation mechanism. Soumis à *Resp. Cell. Mol. Biol.*

Alioua, A., J.P. Huggins, et E. Rousseau. (1995) PKG-I alpha phosphorylates the alpha-subunit and upregulates reconstituted GK_{Ca} channels from tracheal smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 268: L1057-L1063.

Barnes, P. J. (1988) Neuropeptides and airway smooth muscle. *Pharmacol. Ther.* 36 : 119-129.

Belvisi, M.G., C.D. Stretton, M. Miura, G.M. Verleden. S. Tadjkarini, M.H. Yacoub, et P.J. Barnes. (1992b) Inhibitory NANC nerves in human tracheal smooth muscle : a quest for the neurotransmitter. *J. Appl. Physiol.* 73 : 2505-2510.

Belvisi, M.G., J.K. Ward, J.A. Mitchell, et P.J. Barnes. (1995) Nitric oxide as a neurotransmitter in human airways. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 329 : 97-110.

Bernstrom, K., K. Kayganich, R.C. Murphy, et F.A. Fitzpatrick. (1992) Incorporation and distribution of epoxyeicosatrienoic acids into cellular phospholipids. *J. Biol. Chem.* 267: 3686-3690.

Blatz, A.L., et K.L. Magleby. (1984) Ion conductance and selectivity of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J. Gen. Physiol.* 84 : 1-23.

Bolotina, V.M., S. Najibi, J.J. Palacino, P.J. Pagano, et R.A. Cohen. (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 368 : 850-853.

Butler, A., S. Tsunoda, D. McCobb, A. Wei, et L. Salkoff. (1993) mSlo, a complex mouse gene encoding maxi calcium-activated potassium channels. *Science.* 261 : 221-224.

Cadieux, A., C. Lanoue, P. Sirois, et J. Barabé. (1990) Carbamylcholine- and 5-hydroxytryptamine-induced contraction in rat isolated airways: inhibition by calcitonin gene-related peptide. *British Journal of Pharmacology.* 101: 193-199.

Campbell, W.B., D. Gebremedhin, P.F. Pratt, et D.R. Harder. (1996) Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circulation Research.* 78: 415-423.

Capdevilla, J.H., J.R. Falck, et R.W. Estabrook. (1992) Cytochrome P450 and the arachidonic acid cascade. *FASEB Journal*. 6: 731-736.

Carl, A., H.K. Lee, et K.M. Sanders. (1996) Regulation of ion channels in smooth muscles by calcium. *Am. J. Physiol.* 40 : C9-C34.

Cecchi, X., O. Alvarez, et D. Wolff. (1986) Characterization of a calcium-activated potassium channel from rabbit intestinal smooth muscle incorporated into planar lipid bilayers. *J. Memb. Biol.* 91 : 11-18.

Chang, C.-P., S.I. Dworetzky, J. Wang, et M.E. Goldstein. (1997) Differential expression of the α and β subunits of the large-conductance calcium-activated potassium channel : implication for channel diversity. *Mol Brain Res.* 45 : 33-40.

Coburn, R.F. (1977) The airway smooth muscle cell. *Fed. Proc.* 36 : 2692-2697.

Cohen, R.A., et P.M. Vanhoutte. (1995) Endothelium-dependent hyperpolarization : beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation.* 92 : 3337-3349.

Cuthbert, N.J., P.J. Gardiner, K. Nash, et C.T. Poll. (1994) Roles of Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release in agonist-induced contractions in guinea pig trachea. *Am. J. Physiol.* 10 : L620-L627.

Dabrowska, R., D. Aromatorio, J.M.F. Sherry, et D.J. Hartshore. (1977) Composition of the myosin light chain kinase from chicken gizzard. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78 : 1263-1272.

Dabrowska, R., J.M.F. Sherry, D.K. Aromatorio, et D.J. Hartshore. (1978) Modulator protein as a component of myosin light chain kinase from chicken gizzard. *Biochemistry.* 17 : 253-258.

DiChiara, T.J., et P.H Reinhart. (1995) Distinct effects of a Ca^{2+} -and voltage on the activation and deactivation of cloned Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *J. Physiol.* 489 : 403-418.

Douglas, J.S. (1990) Receptors on targets cells. Receptors on airway smooth muscle. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141 : S123-S126.

Drazen, J.M., K.F. Austen, R.A. Lewis, D.A. Clark, G. Gotto, A. Morfat, et E.J. Corey. (1980) Comparative airway and vascular activities of leukotrienes C-1 and D *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77 : 4354-4358.

Dumoulin, M., D. Salvail, S.B. Gaudreault, A. Cadieux, et E. Rousseau. (1997) Epoxyeicosatrienoic acids activate reconstituted K_{Ca} channels from airway smooth muscle. Soumis à *Am. J. Physiol.*

Dworetzky, S.I., J.T. Trojnacki, et V.K. Gribkoff. Cloning and expression of a human large-conductance calcium-activated potassium channel. *Mol. Brain Res.* 27 : 189-193.

Ehlert, F. J., R.S. Ostrom, et G.W Sawyer. (1997) Subtypes of the muscarinic receptor in smooth muscle. *Life Sciences.* 61 : 1729-1740.

Elkins, T., B. Ganetzky, et C.-F. Wu. (1986) A *Drosophila* mutation that eliminates a calcium-dependent potassium current. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83 : 8415-8419.

Ellis, J.L., et B.J. Undem. (1991) Role of peptidoleukotrienes in capsaicin-sensitive sensory fibre-mediated responses in guinea pig airways. *J. Physiol. (Lond).* 436 : 469-484.

Falck, J.R., S. Manna, J. Moltz, N. Chacos, et J. Capdevila. (1983) Epoxyeicosatrienoic acids stimulate glucagon and insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114 : 743-749.

Fang, X., T.L. Kaduce, N.L. Weintraub, M. VanRollins, et A.A. Spector. (1996) Functional implications of a newly characterized pathway of 11, 12-epoxyeicosatrienoic acid metabolism in arterial smooth muscle. *Circulation Research.* 79: 784-793.

Fitzpatrick, F.A., M.D. Ennis, M.E. Baze, M.A. Wynalda, J.E. McGee, et W.F. Liggett. (1986) Inhibition of cyclooxygenase activity and platelet aggregation by

epoxyeicosatrienoic acids : influence of stereochemistry. *J. Biol. Chem.* 261 : 15334-15338.

Fitzpatrick, F.A. et R.C. Murphy. (1988) Cytochrome P-450 metabolism of arachidonic acid: formation and biological actions of "epoxygenase"-derived eicosanoids. *Pharmacological Reviews*.40: 229-241.

Garcia-Calvo, M., H.G. Knaus, O.B. McManus, K.M. Giangiacomo, G.J. Kaczorowski, et M.L. Garcia. (1994) Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 269 : 676-682.

Garland, C.J., F. Plane, B.K. Kemp, et T.M. Cocks. (1995) Endothelium-dependent hyperpolarization : a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol. Sci.* 16 : 23-30.

Gebremedhin, D., Y-H. Ma, R.J. Roman, M. VanRollins, et D.R. Harder. (1992) Cellular mechanism of cerebral epoxyeicosatrienoic acid on cerebral arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology*. 263: H519-H525.

Gerthoffer, W. T. (1991) Regulation of the contractile element of airway smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 261 : L15-L28.

Giangiaco, K., M.L. Garcia, et O.B. McManus. Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry*. 31: 6719-6727, 1992.

Gimenez-Gallego, G., M.A. Navia, J.P. Reuben, G.M. Katz, G.J. Kaczorowski, et M.L. Garcia. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85 : 3329-3333.

Grandordy, B.M., F.M. Cuss, A.S. Sampson, J.B. Palmer, et P.J. Barnes. (1986) Phosphatidylinositol response to cholinergic agonists in airway smooth muscle : relationship to contraction and muscarinic receptor occupancy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238 : 273-279.

Hamaguchi, M., T. Ishibashi, et S. Imai. (1992) Involvement of charybdotoxin-sensitive K^+ channel in relaxation of bovine tracheal smooth muscle by blyceryl trinitrate and sodium nitroprusside. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262 : 263-270.

Hanley, S.P. (1986) Prostaglandins and the lung. *Lung*. 164 : 65-77.

Hashimoto, T., M. Hirata, et Y. Ito. (1985) A role for inositol 1,4,5,-triphosphate in the initiation of agonist-induced contractions of dog tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 86 : 191-199.

Hecker, M., A.T. Bara, J. Bauersachs, et R. Busse. (1994) Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J. Physiol. (Lond)*. 481: 407-414.

Hiramatsu, T., H. Kume, M.I. Kotlikoff, et K. Takagi. (1994) Role of calcium-activated potassium channels in the relaxation of tracheal smooth muscles by forskolin. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*. 21: 367-375.

Hu, S., et H.S. Kim. (1993) Activation of K⁺ channel in vascular smooth muscles by cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid. *Eur. J. Pharm.* 230: 215-221.

Ignarro, L.J., R.E. Byrns, G.M. Buga, et K.S. Wood. (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of the nitric oxide radical. *Circ. Res.* 61 : 866-879.

Jones, T.R., L. Charrette, M.L. Garcia, et G.J. Kaczorowski. (1993) Interaction of iberiotoxin with β -adrenoceptor agonists and sodium nitroprusside on guinea pig trachea. *J. Appl. Physiol.* 74 : 1879-1884.

Kaczorowski, G.J., H.G. Knaus, R.J. Leonard, O.B. McManus, et M.L. Garcia. (1996) High-conductance calcium-activated potassium channels : structure, pharmacology, and function. *J. Bioenerg. Biomemb.* 28 : 255-267.

Kahl, R.A., et A.G. Gilman. (1984) Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulation component of adenylate cyclase by cholera toxin. *J. Biol. Chem.* 259 : 6228-6234.

Kajita, J., et H. Yamaguchi. (1993) Calcium mobilization by muscarinic cholinergic stimulation in bovine single airway smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 264 : L496-L503.

Kapicka, C.L., A. Carl, M.L. Hall, A.L. Percival, B.W. Frey, et J.L. Kenyon. (1994) Comparaison of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in artificial bilayer and patch clamp experiment. *Am. J. Physiol.* 266 : C601-C610.

Karara, A., E. Dishman, I. Blair, J.R. Falck, et J.H. Capdevila. (1989) Endogenous epoxyeicosatrienoic acids: cytochrome P450 controlled stereoselectivity of the hepatic arachidonic acid epoxygenase. *J. Biol. Chem.* 264: 19822-19827.

Karara, A., K. Makita, H.R. Jacobson, J.R. Falck, F.P. Guengerich, R.N. DuBois, et J.H. Capdevila. (1993) Molecular cloning, expression, and enzymatic characterization of the rat kidney cytochrome P-450 arachidonic acid epoxygenase. *J. Biol. Chem.* 268: 13565-13570.

Katoh, T., K. Takahashi, J. Capdevila, A. Karara, J.R. Falck, H.R. Jacobson, et K.F. Badr. (1991) Glomerular stereospecific synthesis and hemodynamic actions of 8,

9-epoxyeicosatrienoic acid in rat kidney. *Am. J. Physiol.* 261: F578-F586.

Kirkpatrick, C.T. (1975) Excitation and contraction in bovine tracheal smooth muscle. *J. Physiol.* 244 : 263-281.

Knaus, H.G., K. Folander, M. Garcia-Calvo, M. L. Garcia, G.J. Kaczorowski, M. Smith, et R. Swanson. (1994) Primary sequence and immunological characterization of β -subunit of high conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel from smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 269 : 17274-17278.

Knox, A.J., et A.F. Tattersfield. (1995) Airway smooth muscle relaxation. *Thorax.* 50 : 894-901.

Knox, A.J., et J.K. Brown. (1991) Differential regulation of Na^+/K^+ ATPase by the cyclic nucleotide dependent protein kinases in airway smooth muscle. *Clin. Res.* 39 : 331A.

Kotlikoff, M.I. (1988) Calcium currents in isolated canine airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 254 : C793-C801.

Kotlikoff, M.I., H. Kume, et M. Tomasic. (1992) Muscarinic regulation of membrane ion channels in airway smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* 43 : 5-10.

Kotlikoff, M.I., et K.E. Kamm. (1996) Molecular mechanisms of β -adrenergic relaxation

of airway smooth muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 58 : 115-141.

Kume, H., A. Takai, H. Tokuno, et T. Tomita. (1989) Regulation of Ca^{2+} dependent K^{+} channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation. *Nature*. 341: 152-154.

Kume, H., I.P. Hall, R.J. Washabau, K. Takagi, et M.I. Kotlikoff. (1994) Beta-adrenergic agonists regulate KCa channels in airway smooth muscle by cAMP-dependent and -independent mechanisms. *J.Clin. Invest.* 93: 371-379.

Kume, H., et M.I. Kotlikoff. (1991) Muscarinic inhibition of single KCa channels in smooth muscle cells by a pertussis-sensitive G protein. *Am. J. Physiol.* 261: C1204-C1209.

Kume, H., K. Mikawa, K. Takagi, et M.I. Kotlikoff. (1995) Role of G proteins and KCa channels in the muscarinic and beta-adrenergic regulation of airway smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 268: L221-L229.

Kwan, C.Y., R.M. Lee, et A.K. Gover. (1983) Intracellular membrane fractionation of rat vas deferens smooth muscle. *Mol. Physiol.* 3 : 53-69.

Leff, A.R. (1988) Endogenous regulation of bronchomotor tone. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137 : 1198-1216.

Li, P.L., A.-P. Zou, et W.B. Campbell. (1997) Regulation of potassium channels in coronary arterial smooth muscle by endothelium-derived vasodilators. *Hypertension*. 29 : 262-267.

Li, P.L. et W.B. Campbell. (1997) Epoxyeicosatrienoic acids activate K⁺ channels in coronary smooth muscle through a guanine nucleotide binding protein. *Circulation Research*. 80: 877-884.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, et R.J. Randall. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.

Matsumoto, K., H. Aizawa, R. Inoue, S. Hamano, S. Ikeda, Z. Xie, M. Hirato, N. Hara, et Y. Ito. (1994) Effects of epithelial cell supernatant on membrane potential and contraction of dog airway smooth muscles. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 10 : 322-330.

Mauger, J.-P. (1994) Régulation du récepteur de l'inositol 1,4,5-triphosphate. *Médecine/Science*. 10 : 1013-1017.

McCann, J.D., et M.J. Welsh. (1986) Calcium-activated potassium channels in canine airway smooth muscle. *J. Physiol. (Lond)*. 372 : 113-127.

McManus, O.B. Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium. (1991) *Journal of Bioenergetics and Biomembrane*. 23: 537-560.

McManus, O.B., L.M.H. Helms, L. Pallanck, B. Ganetzky, R. Swanson, and R.J. Leonard. (1995) Functional role of the β subunit of high-conductance calcium-activated potassium channels. *Neuron*. 14 : 645-650.

Meera, P., M. Wallner, M. Song, et L. Toro. (1997) Large conductance voltage- and calcium-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94 : 14066-14071.

Meurs, H., A. Timmermans, R.G.M. Van Amsterdam, F. Brouwer, H.F. Kauffman, et J. Zaagsma. (1989) Muscarinic receptors in human airway smooth muscle are coupled to phosphoinositide metabolism. *Eur. J. Pharmacol.* 164 : 369-371.

Miller C., E Moczydlowski, R. Latorre, et M. Phillips. (1985) Charybdotoxin, a potent inhibitor of single Ca^{2+} -activated K^+ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature*. 313 : 316-318.

Miller, C., et E. Racker. (1976) Ca^{2+} -induced fusion of fragmented sarcoplasmic reticulum with artificial planar lipid bilayers. *J. Memb. Biol.* 30 : 283-300.

Moczydlowski, E., O. Alvarez, C. Vergara, et R. Latorre. (1985) Effect of phospholipid surface charge on the conductance and gating of a Ca^{2+} -activated K^+ channel in planar lipid bilayers. *J. Memb. Biol.* 83 : 273-282.

Murray, R.K., et M.I. Kotlikoff. (1991) Receptor-activated calcium influx in human airway smooth muscle cells. *J. Physiol. (Lond)*. 435 : 123-144.

Oliw, E.H. (1994) Oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cytochrome P450 monooxygenases. *Prog. Lipid Res.* 33 : 329-354.

Palmer, R.M.J., A.G. Ferrige, et S. Moncada. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 327 : 524-526.

Pinto, A., N.G. Abraham, et K.M. Mullane. (1987) Arachidonic acid-induced endothelial-dependent relaxations of canine coronary arteries: contribution of a cytochrome P-450-dependent pathway. *J. Pharmacol. & Exp. Therap.* 240: 856-863.

Pohl, J., M.P. Walsh, et W.T. Gerthoffer. (1991) Calponin and caldesmon phosphorylation in canine tracheal smooth muscle. *Biophys. J.* 59 : 58a.

Pratt, P.F., M. Rosolowsky, et W.B. (1996) Campbell. Mediators of arachidonic acid-induced relaxation of bovine coronary artery. *Hypertension*. 28: 76-82.

Proctor, K.G., J.R. Falck, et J. Capdevila. (1987) Intestinal vasodilation by epoxyeicosatrienoic acids: arachidonic acid metabolites produced by a cytochrome P450 monooxygenase. *Circulation Research*. 60: 50-59.

Quilley, J., D. Fulton, et J.C. McGiff. (1997) Hyperpolarizing factors. *Bioch. Pharmacol.* 54 : 1059-1070.

Robertson, D.N., A.J. Coyle, K.J. Rhoden, B. Grandordy, C.P. Page, et P.J. Barnes. (1988) The effect of platelet-activating factor on histamine and muscarinic receptor function in guinea pig airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137 : 1317-1322.

Rosolowsky, M., et W.B. Campbell. (1996) Synthesis of hydroxyeicosatetraenoic (HETE) and epoxyeicosatrienoic acid (EETs) by cultured bovine coronary artery endothelial cells. *Biochem. Biophys. Acta.* 1299 : 267-277.

Salvail, D., A. Alioua, et E. Rousseau. (1996) Functional identification of a sarcolemmal chloride channel from bovine tracheal smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 271 : C1716-C1724.

Salvail, D., M. Dumoulin, et E. Rousseau. (1997) 11,12-EET directly modulates the activity of a Ca^{2+} -insensitive Cl^- channel from bovine tracheal smooth muscle. *Soumis à Am. J. Physiol.*

Savaria, D., C. Lanoue, A. Cadieux, et E. Rousseau. (1992) Large conducting potassium channel reconstituted from airway smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 262: L327-L336.

Serabjit-Singh, C.J., S.J. Nishio, R.M. Philpot, et C.P. Plopper. (1988) The distribution of cytochrome P450 monooxygenase in cells of the rabbit lung : an ultrastructural immunocytochemical characterization. *Mol. Pharmacol.* 33 : 279-289.

Somlyo, A.P., et A.V. Somlyo. (1968) Vascular smooth muscle : normal structure, pathology, biochemistry and biophysics. *Pharmacol. Rev.* 20 : 197-272.

Stull, J.T., L.C. Hsu, M.G. Tansey, et K.E. Kamm. (1990) Myosin light chain kinase phosphorylation in tracheal smooth muscle. *J. Biol. Memb.* 265 : 16683-16690.

Thoburn Burns, D. (1994) Cyclodextrins as versatile chiral recognition reagents for use in a variety of optical and separative analyses. *J. Pharm. Biol. Anal.* 12 : 1-3.

Tomasic, M., J.P. Boyle, J.F. Worley III, et M.I. Kotlikoff. (1992) Contractile agonists activate voltage-dependent calcium channels in airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 32 : C106-C113.

Torphy, T.J., W.B. Freese, G.A. Rinard, L.L. Burton, et S.E. Mayer. (1982) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases in airway smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 257 :

11609-11616.

Vargara, C., et R. Latorre. (1983) Kinetics of Ca^{2+} -activated K^+ channels from rabbit muscle reconstituted into planar lipid bilayers. *J. Gen. Physiol.* 82 : 543-568.

Voet, D., et J.G. Voet. (1990) Biochemistry. Wiley. New-York. Chap. 34.

Vrolix, M., L. Raeymaekers, F. Wuytack, F. Hofmann, et R. Casteels. (1988) Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasmalemmal Ca^{2+} pump of smooth muscle via phosphorylation of phosphatidylinositol. *Biochem. J.* 255 : 855-863.

Wang, Y.-X., B.K. Fleischmann, et M.I. Kotlikoff. (1997) M_2 receptor activation of nonselective cation channels in smooth muscle cells : calcium and G_i/G_o requirements. *Am. J. Physiol.* 273 : C500-C508.

Ward, J.K., P.J. Barnes, S. Tadjikarimi, M.H. Yacoub, et M.G. Belvisi. (1995a) Evidence for the involvement of cGMP in neural bronchodilator responses in human tracheal. *J. Physiol.* 483 : 525-536.

Wei, A., C. Solaro, C. Lingle, et L. Salkoff. (1994) Calcium sensitivity of BK-type K_{Ca} channels determined by a separable domain. *Neuron.* 13 : 671-681.

Wong, P.Y., K.T. Lin, Y.T. Yan, D. Ahern, J. Iles, S.Y. Shen, R.K. Bhatt, et J.R. Falck. (1993) 14(R),15(S)-Epoxyeicosatrienoic acid (14(R),15(S)-EET) receptor in guinea pig mononuclear cell membranes. *J. Lip. Med.* 6: 199-208.

Worley, J.F., et M.I. Kotlikoff. (1990) Dihydropyridine-sensitive single calcium channels in airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 259 : L468-L480.

Xie, Z., H. Hakoda, et Y. Ito. (1992) Airway epithelial cells regulate membrane potential, neurotransmission, and muscle tone of the dog airway smooth muscle. *J. Physiol.* 449 : 619-639.

Zeldin, D.C., J.D. Plitman, J. Kobayashi, R.F. Miller, J.R. Snapper, J.K. Falck, J.L. Szarek, R.M. Philpot, et J.H. Capdevila. (1995) The rabbit pulmonary cytochrome P450 arachidonic acid metabolic pathway: characterization and significance. *J. Clin. Invest.* 95: 2150-2160.

Zeldin, D.C., J. Kobayashi, J.R. Falck, B.S. Winder, B.D. Hammock, J.R. Snapper, et J.N. Capdevila. (1993) Regio- and enantiofacial selectivity of epoxyeicosatrienoic acid hydration by cytosolic epoxide hydrolase. *J. Biol. Chem.* 268 : 6402-6407.